

## COMMUNICATIONS

---

### **Électrophorèse des protéines sériques selon l'âge chez le cheval de selle cliniquement normal**

par Roland PERRIN\*, Thérèse FOULON\*\*, Paule GROSLAMBERT\*\*  
et Paul GROULADE\*\*\*

---

#### RÉSUMÉ

Deux groupes de chevaux sont étudiés : 10 chevaux militaires et 50 chevaux de centres hippiques, âgés de 6 mois à 32 ans. L'électrophorèse est réalisée sur acétate de cellulose, bande 170 x 25 mm, tampon pH 9,6, voltage 220 v., intensité 12 mA, migration 4 h 30. La détermination des fractions est établie par migration comparée sérum humain-sérum de cheval. Six fractions sont identifiées : albumine, alpha 1, alpha 2, bêta 1, bêta 2, gamma, avec un tracé expressif et reproductible. Des illustrations avec tracés et bandes sont présentées. La conservation du sérum et l'évolution avec l'âge sont étudiées.

*Mots clés* : Électrophorèse - Protéines - Cheval - Âge.

#### SUMMARY

##### SERUM PROTEINS ELECTROPHORESIS AND THEIR AGE VARIATIONS AMONG CLINICALLY NORMAL SADDLE HORSES

We studied two groups of horses : 10 military horses, 50 riding center horse, aged 6 months to 32 years.

Electrophoresis is performed on 170 x 25 mm bands cellulose acetate, buffer pH 9.6, voltage 220 v., 12 mA, migration 4 h 30. Fractions détermination is done by comparing human and horse serum migration. Six fractions are identified : albumin, alpha 1, alpha 2, beta 1, beta 2, gamma with an expressive, reproductible profile. Illustrations with profiles and bands are shown. Serum conservation and age evolution are studied.

*Key words* : Electrophoresis - Proteins - Horse - Age.

---

\* Clinique équine des Yvelines, 18, rue des Champs - La Brosse - 78470 Saint-Lambert-des-Bois.

\*\* Biochimie Médicale A, CHU, BP 217X - 38043 Grenoble, cedex 9.

\*\*\* 11 rue Ernest Cresson - 75014 Paris.

Les résultats de l'électrophorèse des protéines sériques se jugent sur la morphologie du tracé et la valeur des différentes fractions (valeur relative ou absolue). L'appréciation des changements apportés par l'état pathologique, pour être utile, exige la connaissance des données électrophorétiques du sujet en bon état de santé ou normal. En ce qui concerne le cheval, les divergences dans les résultats publiés sur le nombre et la dénomination des fractions, nous ont conduits à réaliser une recherche sur les valeurs de chevaux normaux. Nous présentons ici les résultats de cette étude.

## I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Notre étude porte sur deux groupes de chevaux :

Groupe I : 10 chevaux militaires âgés de 3 à 10 ans.

Groupe II : 50 chevaux de Centres Hippiques de l'Île-de-France âgés de 6 mois à 32 ans, que nous avons répartis en 4 lots selon l'âge :

Lot A : 10 sujets de 6 mois à 3 ans.

Lot B : 20 sujets de 4 à 12 ans.

Lot C : 10 sujets de 13 à 19 ans.

Lot D : 10 sujets de 20 à 32 ans.

Un cheval a été suivi de 32 à 35 ans.

Les prélèvements de sang ont été faits sur tube sec, après 12 heures de jeûne pour le groupe I et seulement 4 à 6 heures pour le groupe II.

*Technique de l'électrophorèse* : l'électrophorèse des protéines sériques est réalisée [1] dans un appareil à évaporation réduite, avec un dépôt de 6  $\mu$ l pour 70 g/l de protéines, sur bandes d'acétate de cellulose gélifié de 170 x 25 mm (cellogel Sebia), tampon à pH 9,6, voltage 220 volts aux bornes du générateur, intensité de 12 mA pour 11 bandes, temps de migration 4 h 30, coloration à l'Amidochwartz 10 B, lecture densitométrique sur cellosystem 2. Les longueurs de la courbe et de la migration électrophorétique sont pratiquement identiques (90 mm).

*La reproductibilité* intra-série a été étudiée par une électrophorèse du même sérum de cheval sur 10 bandes d'acétate de cellulose dans le même bac de migration.

*La conservation du sérum* à + 4°C : l'étude a porté sur 11 semaines ; l'électrophorèse a été faite sur le sérum frais, puis, chaque semaine, à partir de la 2<sup>e</sup> semaine, sur le même sérum, conservé à + 4°C.

*Étude statistique* : la comparaison des moyennes des différents paramètres selon l'âge est effectuée par analyse de variance, suivie du test de Student, en cas de moyennes significativement différentes.

## II. RÉSULTATS

### 1. Reproductibilité :

L'épreuve de reproductibilité indique (tableau ci-dessous) une fiabilité satisfaisante de la technique utilisée.

	Albumine %	Alpha 1 %	Alpha 2 %	Bêta 1 %	Bêta 2 %	Gamma %
X	37.41	5.67	14.02	14.55	5.36	22.97
S	1.48	0.70	0.36	0.41	0.78	0.72
CV	3.9	12.3	2.6	2.8	14.5	3.1

### 2. Identification des différentes fractions

Cette détermination a été établie par migration comparée du sérum humain et du sérum de cheval (fig. 1). Six fractions ont été identifiées : albumine, alpha 1, alpha 2, bêta 1, bêta 2, gamma.

*L'albumine* représente la fraction la plus importante et la plus rapide.

*Les globulines alpha 1* se situent très proches de l'albumine, soit en épaulement (80 % des cas), soit en pic discret (20 % des cas).

*Les globulines alpha 2* sont formées de 2 pics, le plus important est le plus lent.

*Les globulines bêta 1* sont bien individualisées (fig. 1).

*Les globulines bêta 2*, mal individualisées dans la moitié des cas, sont toujours identifiables (fig. 2).

*Les globulines gamma* se présentent en une masse à base large, de morphologie variable avec l'âge (fig. 1 et 2).

Il y a peu de différence entre le *sérum* et le *plasma* (fig. 3). La majoration des bêta et gamma globulines est due au fibrinogène.

### 3. Conservation d'un sérum à + 4°C.

Les résultats sont représentés sur la figure 4a.

Nous notons une variation à la 4<sup>e</sup> et à la 5<sup>e</sup> semaine : le pourcentage d'albumine est plus bas, celui des globulines plus élevé. Ceci est en rapport avec une difficulté due à toute technique électrophorétique. Lorsque la quantité de protéines déposées sur la bande est trop élevée, l'albumine n'est pas complètement colorée, sa valeur est obtenue par défaut et celle des globulines par excès.

Au bout de 11 semaines, on ne note pas de variation des protéines totales, ni de leur répartition électrophorétique.

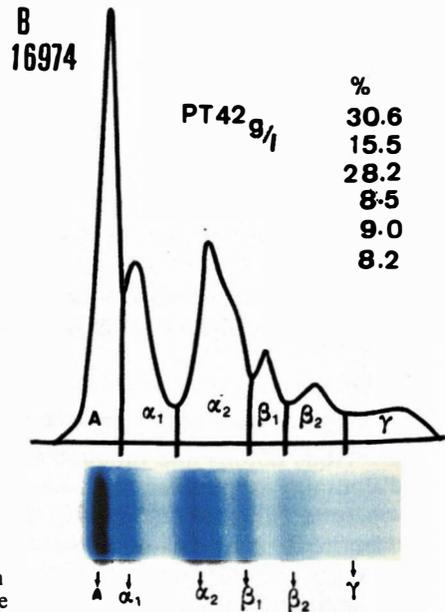
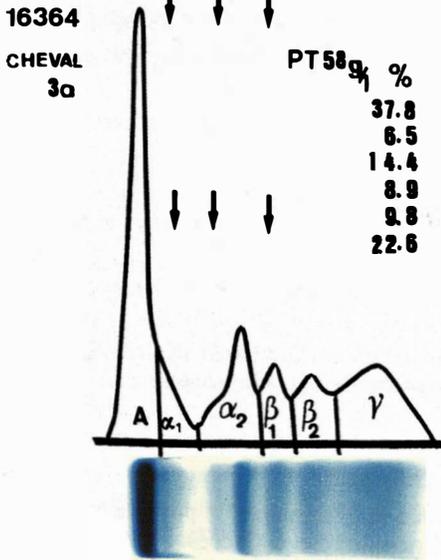
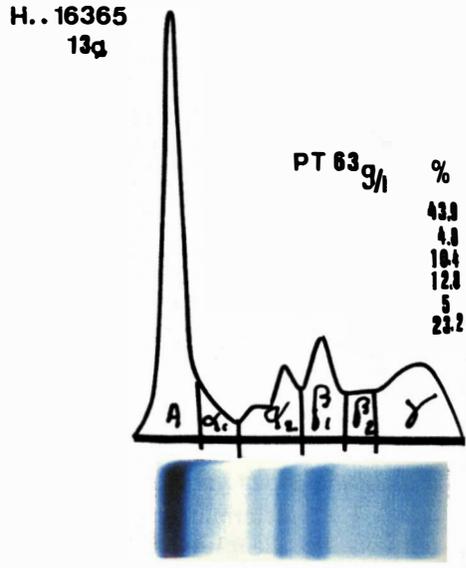
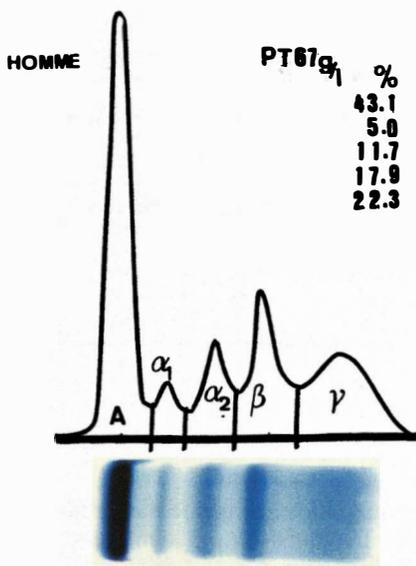


fig. 1

Migration comparée de sérum humain et de sérum de cheval où est indiquée la situation de l'albumine et des globulines avec une séparation nette des globulines bêta 1 et bêta 2.

fig. 2

La globuline bêta 2 est difficile à individualiser.

fig. 7

Cheval présentant un abcès périrénal. Les modifications dues à l'état pathologique mettent en évidence les différentes fractions telles que nous les avons désignées (fig. 1).

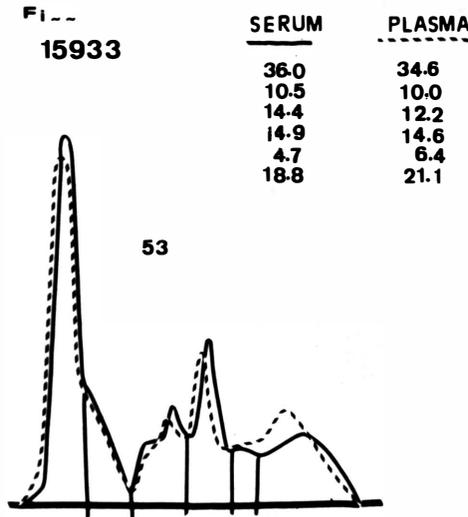


fig. 3

Sérum (trait plein) - Plasma (trait pointillé) du même cheval. Discret décalage de l'albumine, majoration des globulines bêta 2 et gamma du plasma par rapport au sérum.

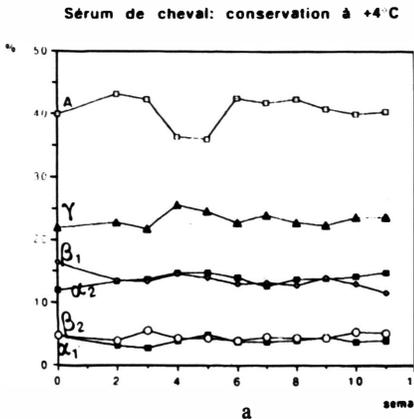
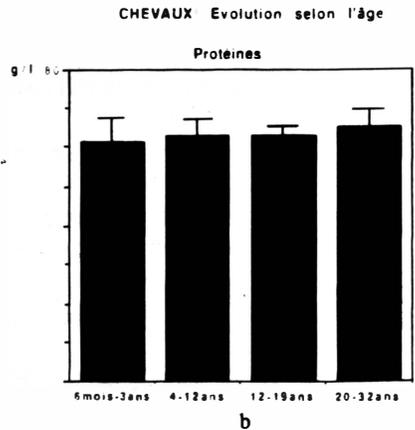


fig. 4



a): Conservation du sérum à +4°, pendant 11 semaines. Électrophorèse chaque semaine. Les variations de l'albumine et des globulines gamma à la 4<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> semaine sont dues à un dépôt excessif de protéines. A la 11<sup>e</sup> semaine protéines totales et répartition des globulines ne sont pas modifiées.

b): Variations des protéines totales avec l'âge.

#### 4. Évolution selon l'âge

Les résultats sont regroupés dans le tableau I.

a) Pour le groupe I, seule la protéinémie est significativement inférieure à celle du lot B du groupe II, d'âge similaire. Ceci peut être dû à la différence du travail accompli et au fait que la durée du jeûne est plus longue pour le groupe I que pour le groupe II.

Tableau I : Protéines : valeurs normales chez le cheval en fonction de l'âge.

	II A	II B	I	II C	II D
	6 mois à 3 ans; n=10	4 à 12 ans; n=20	3 à 10 ans; n=10	13 à 19 ans; n=10	20 à 32 ans; n=10
Albumine %	44,18 +/- 3,52	41,62 +/- 4,79	42,13 +/- 3,76	42,23 +/- 3,08	38,6 +/- 4,26
Alpha1 %	5,43 +/- 0,94	6,03 +/- 1,02	5,21 +/- 1,57	4,82 +/- 0,88	5,29 +/- 1,28
Alpha2%	16,3 +/- 3,3	13,4 +/- 1,77	13,56 +/- 0,66	12,87 +/- 1,46	14,44 +/- 2,52
Beta1 %	11,83 +/- 3,15	11,41 +/- 2,36	11,25 +/- 1,79	12,1 +/- 2,28	12,7 +/- 4,18
Beta2 %	6,29 +/- 1,59	6,08 +/- 2,68	8,33 +/- 0,68	5,75 +/- 1,69	8,65 +/- 2,45
Gamma %	16,19 +/- 3,91	21,52 +/- 3,27	22,45 +/- 6,08	22,22 +/- 4,03	20,41 +/- 4,07
Protéines g/l	61,4 +/- 6,06	62,95 +/- 4,26	58,7 +/- 5,93 *	63 +/- 2,4	65,4 +/- 4,27
Albumine g/l	27 +/- 2,09	26,07 +/- 2,34	24,68 +/- 2,71	26,61 +/- 1,91	25,22 +/- 2,45
Alpha1 g/l	3,56 +/- 1,17	3,83 +/- 1,1	3,05 +/- 0,94	2,97 +/- 0,85	3,46 +/- 0,86
Alpha2 g/l	9,52 +/- 1,33	8,42 +/- 1,33	7,95 +/- 0,75	8,11 +/- 1,1	9,24 +/- 2,19
Beta1 g/l	7,35 +/- 2,31	7,1 +/- 1,56	9,82 +/- 2,27	7,08 +/- 1,47	8,42 +/- 3,12
Beta2 g/l	3,89 +/- 1,26	3,86 +/- 1,88		4,33 +/- 2,35	5,64 +/- 1,6
Gamma g/l	9,99 +/- 2,88	13,61 +/- 2,58	13,68 +/- 4,24	14 +/- 2,76	13,26 +/- 2,49

\* p < 0,05 par rapport au groupe II B

b) Pour le groupe II (tabl. I et fig. 4b, 5), les variations significatives se traduisent par :

- une diminution significative de l'albumine dans le dernier intervalle 20-32 ans, par rapport au jeune et à l'adulte ;
- une valeur maximale des globulines alpha 1 dans l'intervalle 4-12 ans et une baisse entre 13 et 19 ans ;
- des globulines alpha 2 plus élevées chez le jeune ;
- une valeur supérieure de la fraction bêta 2 dans la tranche 20-32 ans ;
- des globulines gamma plus basses chez le jeune.

Le cheval suivi entre 32 et 35 ans confirme la diminution de la fraction gamma, qui s'amorçait dans la tranche 20-32 ans (fig. 6).

La *morphologie* de la courbe ne se modifie pratiquement pas avec l'âge pour l'albumine, les globulines alpha 1, alpha 2, et bêta 1. L'individualisation de la fraction bêta 2 est souvent plus difficile dans l'intervalle 20-32 ans. Ceci pourrait s'expliquer par l'augmentation de certaines classes

CHEVAUX: Evolution selon l'âge

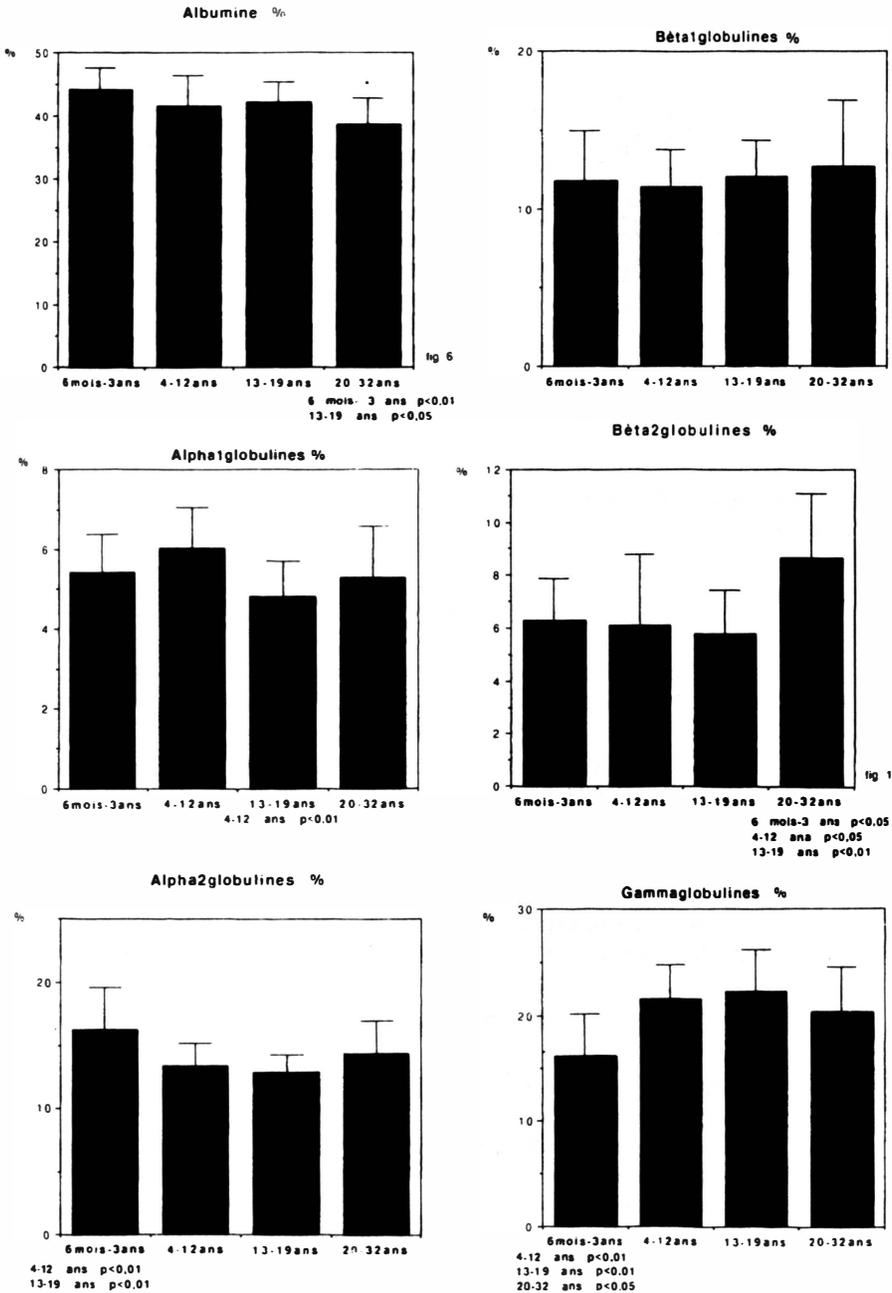


fig. 5

Variations de l'albumine et des globulines avec l'âge.

Electrophorèse des protéines: cheval suivi de 32 à 35 ans

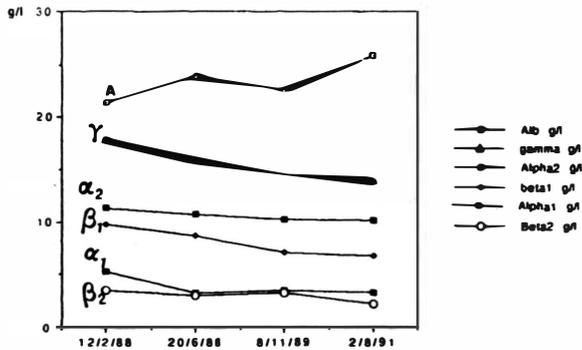


fig. 6

Variations de l'albumine et des globulines chez un cheval de 32 à 35 ans.

et sous-classes d'immuno-globulines, migrant dans la zone bêta 2 - gamma.

### III. DISCUSSION

L'image électrophorétique, que nous proposons, est basée sur 3 arguments, dont les 2 premiers ont été signalés par V. NORMAND dans sa thèse [2]:

a) la migration comparée sérum humain, sérum de cheval situe la correspondance des emplacements des différentes fractions (fig. 1);

b) pour les globulines alpha 1, la présence à l'immuno-électrophorèse [3] des 3 arcs représentant ces globulines très proches de l'albumine, comme sur notre tracé;

c) le fractionnement explicite dans un cas pathologique (fig. 7) où la majoration des globulines leur donne une individualisation sans équivoque.

Notre proposition est confortée par des études antérieures:

#### 1. Sur papier:

R. CHARY, R. DUFOUR [4], en 1965, distinguent "l'existence habituelle" de six composants: albumine, 2 fractions alpha, 2 fractions bêta, une fraction gamma. Ils signalent l'impossibilité d'identifier les globulines alpha 1 dans 15% des cas, et bêta 2 dans 27%. Sur acétate de cellulose, cette impossibilité devient une difficulté. A l'analyse statistique, ils constatent que l'âge, 4 à 14 ans, apporte une diminution de l'albumine, comme nous l'avons observé, mais de façon non significative.

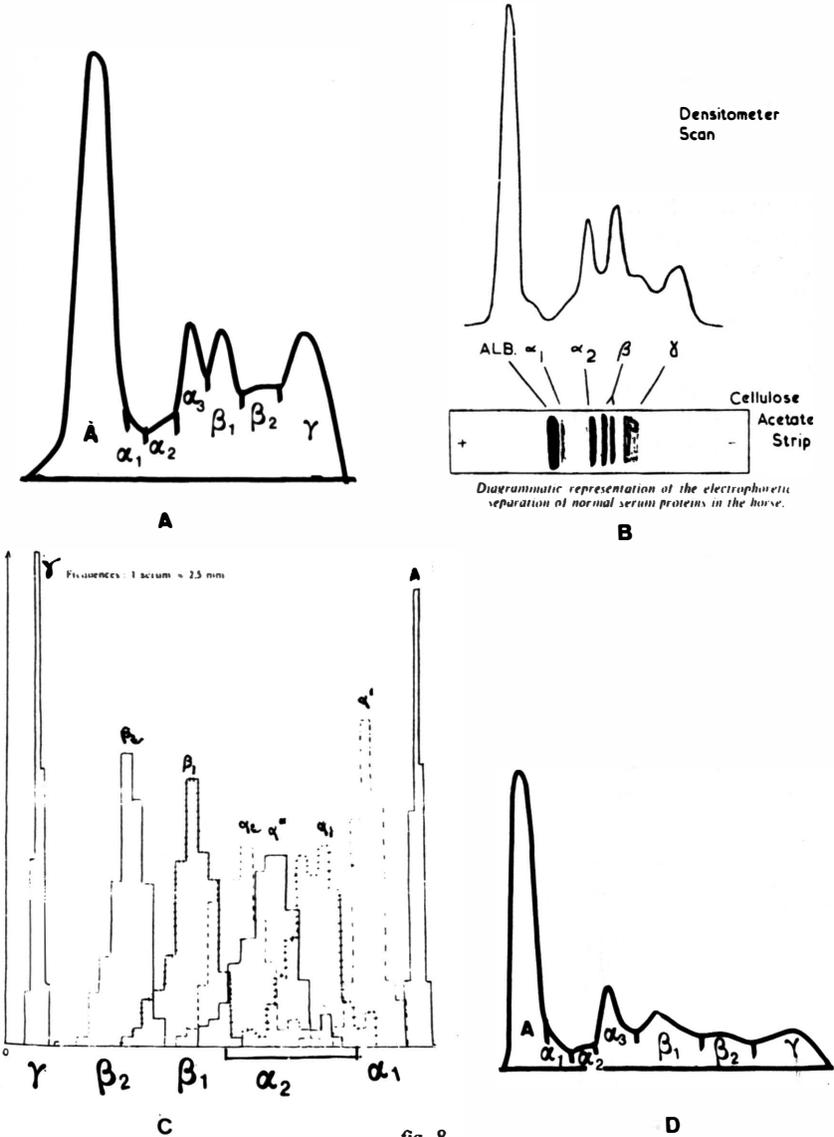


fig. 8

- A) Sur papier, d'après I. HORT [5]. La séparation est remarquable avec ce support.  $\alpha_2 + \alpha_3$  représentent notre  $\alpha_2$ .
- B) Sur Acétate, d'après L.B. JEFFCOTT [6]. Les séparations sont identiques aux nôtres.
- C) Distribution des différentes fractions selon leur parcours électrophorétique d'après J.F. PICHOT [7]:  $\alpha'$  est notre  $\alpha_1$ ,  $\alpha_1 + \alpha'' + \alpha_2$  représentent notre  $\alpha_2$ . Les chevauchements et les superpositions constatées justifient cette interprétation.
- D) Sur Acétate, d'après A. MASSIP et I. FUMIÈRE [8],  $\alpha_2 + \alpha_3$  représentent notre  $\alpha_2$ .

I. HORT [5] en 1968, sur papier également, présente une séparation remarquable, où nos alpha 2 sont représentées par alpha 2 + alpha 3 (fig. 8A). Il est regrettable que les études ultérieures n'y aient pas prêté plus d'attention.

## 2. Sur acétate de cellulose :

L. B. JEFFCOTT [6] (fig. 8B) donne une séparation des fractions identique à la nôtre. J.P. PICHOT [7] établit un histogramme (fig. 8C) suivant les "parcours électrophorétiques des différentes fractions". Cette présentation est en accord avec la nôtre, si on admet que alpha' est alpha 1 et que alpha 1 + alpha " + alpha 2 représentent alpha 2. Cette interprétation nous paraît logique en raison des chevauchements et des superpositions constatés dans cette dernière zone.

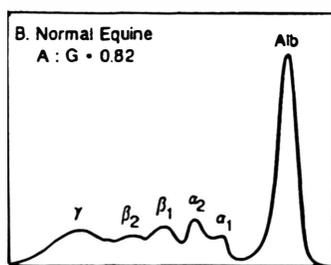
Les séparations de A. MASSIP et I. FUMIÈRE [8] (fig. 8D) ainsi que celle de G.R. KIRK, D.F. HUTCHESON, S. NEATE [9] ne diffèrent de la nôtre que par l'appellation alpha 3 de la composante rapide alpha 2.

Le fractionnement proposé par W. BIERER [10] paraît difficilement reproductible. Un regroupement raisonnable rejoindrait notre proposition.

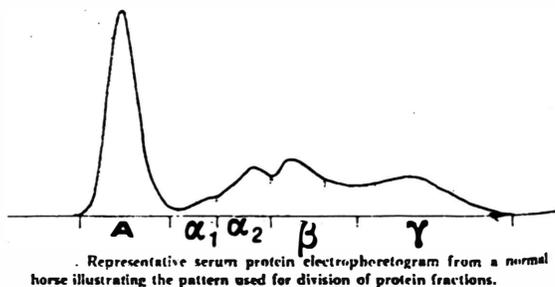
Par contre, nous sommes en désaccord avec les tracés de N. ECK [11] et J.J. KANEKO [12] (fig. 9E), qui font de la composante rapide alpha 2, la fraction alpha 1, ignorant ainsi la véritable alpha 1.

Enfin l'imprécision de tracés, tels que celui de K.R. PIERCE [13] (fig. 9F) ne permet pas de les prendre en considération.

La diversité dans la désignation et la représentation graphique des fractions globuliniques rend impossible la confrontation des résultats publiés, concernant les valeurs.



E



F

fig. 9

E) Sur Acétate, d'après J.P. KANEKO [12] : alpha<sub>1</sub> + alpha<sub>2</sub> représentent notre alpha<sub>2</sub>, c'est-à-dire qu'alpha<sub>1</sub> est absente.

F) Sur Acétate de cellulose, d'après H. PIERCE [13]. L'exemple type du résultat d'électrophorèse dont l'imprécision est de nature à déconsidérer cet examen.

## CONCLUSION

La réalisation de l'électrophorèse des protéines sériques, chez le cheval de selle dans les conditions que nous avons indiquées, a permis d'identifier 6 fractions : albumine, alpha 1, alpha 2, bêta 1, bêta 2, gamma. Nous avons établi un tracé expressif, et reproductible. Nous pensons que ces qualités nous autorisent à proposer nos résultats comme une référence acceptable. La conservation du sérum est bonne à + 4°C pendant 11 semaines. Avec l'âge, nous notons, principalement, des globulines alpha 2 plus élevées et des globulines gamma plus basses chez le jeune, une albuminémie plus basse chez le sujet âgé.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] GROULADE (J.), MILANO (J.M.). - Électrophorèse sur acétate de cellulose des protéines sériques de l'homme normal. Thèse de Médecine, Grenoble, 1974, n° 18, 68 pages.
- [2] NORMAND (V.). - Modifications électrophorétiques des protéines sériques observées sur un lot de chevaux âgés. Thèse vétérinaire, 1991 ; Alfort.
- [3] HENSEN (J.B.). - Immuno-electrophoretic pattern of normal horse with the demonstration of beta globuline types *Amer. J. Vet. Res.*, 1964, 1 706-1 711.
- [4] CHARY (R.), DUFOUR (R.). - Analyse électrophorétique du sérum de cheval. *Rev. des Services Biol. et Vét. des Armées*, 1965, 4, 173-179.
- [5] HORT (I.). - Paper electrophoretic fractionation and chemical determination of horse proteins and lipoproteins. *Amer. J. Vet. Res.* 1968, 29, 513-515.
- [6] JEFFCOTT (L.B.), DOXEY (D.L.). - Laboratory aids to clinical diagnosis in equine practice. *Equine Veterinary journal*, 1971, 3, 25-30.
- [7] PICHOT (J.F.). - Étude électrophorétique des protéines sériques du cheval. Thèse Vétérinaire, 1977, Lyon.
- [8] MASSIP (A.), FUMIÈRE (I.). - Analyse électrophorétique des protéines du sérum sanguin de chevaux adultes normaux âgés de 4 à 10 ans. *An. de Méd. Vét.*, 1974, 118, 221-229.
- [9] KIRK (G.R.), HUTCHESON (D.P.), NEATS (S.). - Electrophoric pattern of serum protein in clinically normal horses and ponies with laminitis. *Veterinary medicine/Small animal clinical-equine practice*. 1975, 3, 337-339.
- [10] BIERER (B.W.). - Electrophoretic analysis of blood and plasma proteins of normal horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1969, 30, 12, 2 337-2 341.
- [11] EK (N.). - Studies of electrophoresis on cellulose acetate membrane of serum protein from normal horses, sheep, and pigs. *Acta. Vet. Scand.*, 1970, 11, 295-304.
- [12] KANEKO (J.J.). - Clinical biochemistry of domestic animals. 1989, 4 th edition. Éditeur Academic Press.
- [13] PIERCE (K.R.). - Assay of equine serum proteins by clinical chemical and electrophoretic methods. *Proc. IST. Internat. symp. Eq. Hematol.*, 1975, 144-150.