

EXPLORATION
DES
PROTÉINES PLASMATIQUES

INTRODUCTION

- Plus *de 125 protéines* différentes
- la plupart synthétisée au niveau *hépatique*
- Leurs propriétés sont *très variables*
- Différencier les protéines toujours présentes dans le *plasma*, et celles, d'origine *cellulaire*, n'y apparaissant que transitoirement.
- Les protéines → *plus grande partie* des matières solides du Plasma : *65 à 75 g/l* .

- Toutes les prot. sont des *hétéroprotéines* pouvant contenir :
 - Des lipides (lipoprotéines),
 - Des métaux (métalloprotéines) et
 - Surtout des glucides
- Sauf l'albumine qui est une *holoprotéine*
 - la *plupart* des prot. plasmatiques sont des *glycoprotéines*.
 - En dehors du *fibrinogène*, protéine *fibreuse*, ce sont toutes des protéines *globulaires*.

VARIATIONS DE LA PROTIDÉMIE

- Une *augmentation* (\nearrow) est due à une diminution (\searrow) du volume de distribution (déshydratation) ou une \nearrow de synthèse prot. (ex: Ig....)
- Une \searrow est due à une \nearrow du vol. plasmatique (hyperhydratation)
- *Ces variations* de [Prot. Plasma] sont *précieuses* pour l'évaluation de l'état d'hydratation des patients
- La \searrow peut aussi être due à une \nearrow de la perméabilité capillaire \rightarrow fuites prot. (diffusion vers l'espace interstitiel) ex: syndromes inflammatoires.

RÔLES DES PROTÉINES PLASMATIQUES

- a) Maintien de la pression oncotique.
- b) Fonction de transport.
- c) Inhibiteurs des protéases.
- d) Cofacteur d'enzyme.
- e) Facteurs de la coagulation.
- f) Rôle immunitaire.

MAINTIEN DE LA PRESSION ONCOTIQUE

- Les protéines peuvent s'hydrater fortement → une pression osmotique capable de retenir l'eau dans le secteur vasculaire.
- Ce rôle est assuré par l'ensemble des protéines mais principalement par *la sérum-albumine*.

L'ALBUMINE

- Dans le plasma : sa *concentration est la plus élevée*:
33-55g/l
- Synthétisée par l'hépatocyte.
- Holoprotéine de 66 400 Da.
- Sa demi-vie est de 20 jours environ.
- Migration électrophorétique rapide.

VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES

- Grossesse (-25%)
 - Perfusions (-30%)
 - Prise de contraceptifs (-15%)
- 1- *Taux d'albumine élevé* dans le sang est lié à :
- Déshydratation
 - Pertes liquidiennes
 - Diabète insipide

VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES

2- Taux d'albumine bas :

- Dénutrition (anorexie)
- Insuffisance hépatique (synthèse \searrow)
- Inflammations sévères
- Syndrome néphrotique (pertes dans les urines)
- Maladie de Crohn (infla. du T.D, M. coeliaque (infla. par réaction auto-immune au gluten, déséquilibre de la flore microb. \rightarrow malabsorption de Vit., de sels minéraux...), brûlures, etc....

LES GRANDES FONCTIONS DE L'ALBUMINE :

- Maintien de la *p. oncotique intravasculaire* (pour environ 80 %). Une albuminémie faible → la formation d'œdème.
- *Transport* de nombreuses substances : *bilirubine*, *acides gras*, *cations* (Ca^{++} , Ni^{++} , Cu^{++}), *hormones* (rôle de réservoir de T4, stéroïdes...), *médicaments* (ex: diphénylhydantoïne...) et autres.

RÔLE DE TRANSPORT

- En dehors de la sérum-albumine
- On cite : la transferrine, la céruloplasmine, la transcortine (cortisol), la transthyrétine(thyroxines) ainsi que les lipoprotéines (transport + ou - spécifique).

LA TRANSFERRINE

- Glycoprotéine monomérique de PM d'environ 80 KDa.
- Protéine de transport du fer.
- Synthèse hépatique et inversement proportionnelle à la quantité de fer présente dans la cellule.
- *Les taux usuels sont de 1,5 à 3 g/l*

RÔLE INHIBITEUR DE PROTÉASE

- Protéines possédant des propriétés inhibitrices vis-à-vis des protéases diverses circulant dans le plasma.
- Ex: α 1 antitrypsine/trypsine, antiplasmine/plasmine

L'ANTI-PROTÉASE OU L' α 1-ANTITRYPSINE

- Capable d'inhiber la trypsine et bien d'autres sérine-protéases
- *le taux normal est de 2 à 4 g/l.*

L' α 2-MACROGLOBULINE

- Glycoprotéine volumineuse de P.M= 750 KDa.
- Se combine aux diverses enzymes protéolytiques circulantes
- Limite les effets néfastes de la réaction inflammatoire en inhibant les enzymes lysosomales déversées.
- *Les valeurs de référence sont: 2 à 3,5 g/l.*

RÔLE DE COFACTEUR D'ENZYMES

L' α 1-acide glycoprotéine: orosomucoïde:

- Glycoprotéine la plus riche en glucides de faible PM=41 KDa.
- Synthèse et catabolisme hépatique.
- Taux : 0.4 a 1.4 g/L.
- Coenzyme des LPL hydrolysant les TG.
- Inhibiteur de l'agrégation des plaquettes.
- Très bon marqueur de l'inflammation

RÔLE DANS LA COAGULATION

- Le fibrinogène :
- C'est une glycoprotéine, PM= 330 KDa
- Synthétisé essentiellement dans le foie
- *Les valeurs de référence chez l'adulte sont 2,5 à 3,5 g/l.*

RÔLE IMMUNITAIRE

Les immunoglobulines :

- Support de l'immunité humorale, sous forme d'anticorps.
 - Fabriquées par les plasmocytes
 - Formées de 4 chaînes polypeptidiques: 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères
- L'Ig (4 chaînes glycosylées) P.M 150 KDa.

Isotype d'Ig	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Taux en g/l	8 à 12	2 à 4	0,6 à 1,2	0,1 à 0,3	0,1 à 0,5

Structures particulières

L' Ig M présente une structure pentamérique

Elle atteint ainsi un PM de 800 à 1 000 KDa.

EXPLORATION BIOCHIMIQUE

- Détermination de l'*hémogramme* (hématocrite, FNS, VS....) pour déceler une éventuelle *hémodilution* ou une *hémococoncentration*.
- Dosage *global* puis *individuel* de telle ou telle protéine.
- Regroupement de quelques dosages, sous le terme de *profil protéique*
- *Electrophorèse* sur différents supports
- *Immunoélectrophorèse* dans le cadre d'une gammopathie

DOSAGE DES PROTÉINES TOTALES.

Réaction du biuret “Méthode colorimétrique”

- Condensation de deux molécules d'urée $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$, qui en présence de Cu en milieu alcalin, donne un complexe bleu violet
- De même les protéines avec le sulfate de Cu vont réagir par leur liaison peptidique.
- L'intensité de la coloration lue à 546 nm est proportionnelle à la concentration en protéines dans le milieu.

ELECTROPHORÈSE DES PROTÉINES PLASMATIQUES

Principe :

- L'électrophorèse consiste à faire migrer et à fractionner grâce à un champ électrique, au sein d'un milieu variable et dans un tampon de pH déterminé, les protéines séparées par leur *charge électrique*.
- La migration se fait par une phase liquide imprégnant une phase solide (gel)

Séparation sous forme de *bandes* révélées par différents colorants.

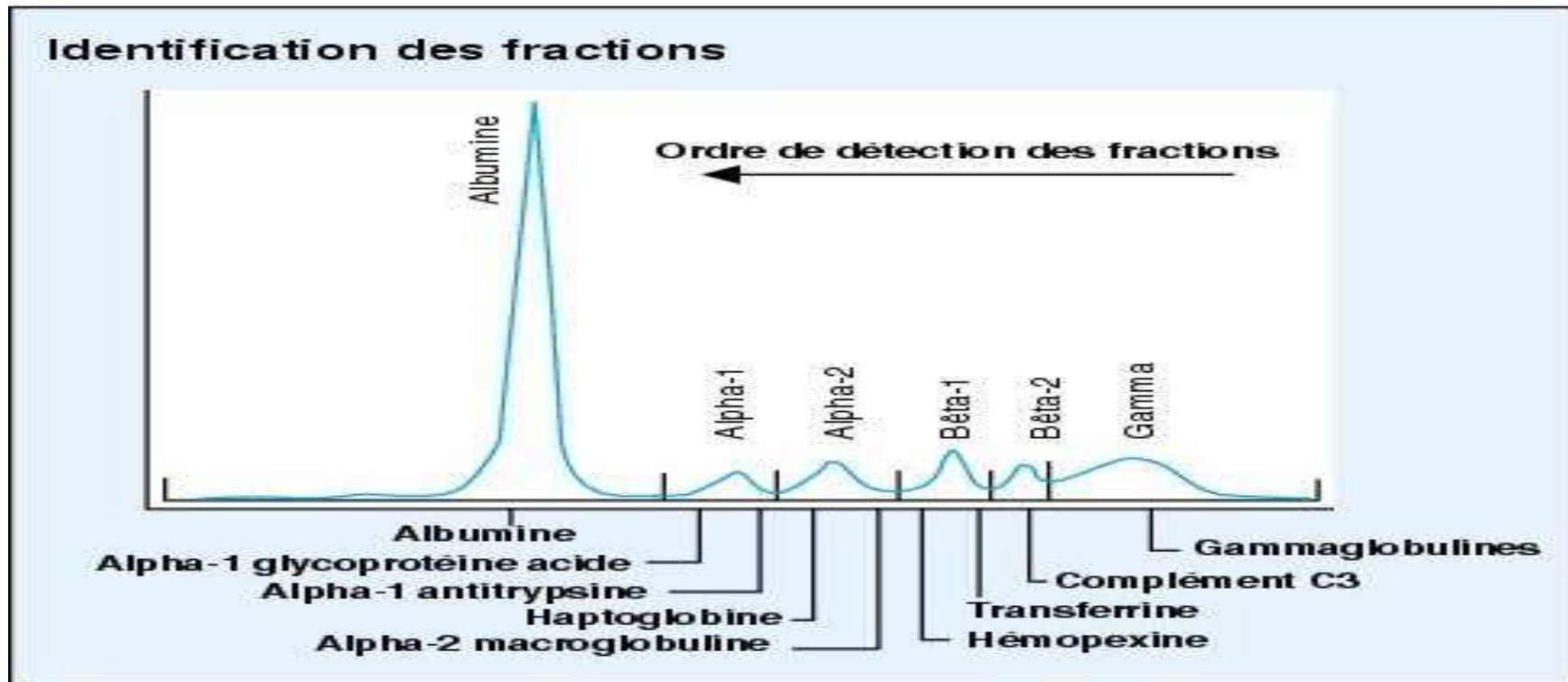
Technique :

- *Dépôt de quelques microlitres de sérum sur le support*
 - *Choisir un tampon, généralement à pH 8,6 → les protéines s'ionisent en anions*
 - *Migration durant un tps en fonction du support : 15 à 25 minutes pour l'acétate, 30 à 60 minutes pour le gel de polyacrylamide.*
 - *Fixation et coloration.*
 - *Protéinogramme standard , les colorants les plus utilisés sont : l'amidoschwarz, le rouge Ponceau ou le bleu de Coomassie.*

- *La lecture photodensitométrique* de la coloration de chaque bande donne le tracé classique où apparaissent les 5 pics : Albumine, α_1 , α_2 , β et γ -globulines.
- *L'intégration de la surface de chaque pic* :
 - conduit à *un pourcentage* de chaque fraction,
 - s'exprime aussi en *gramme/litre* si le taux des protéines totales a été donné à l'appareil.

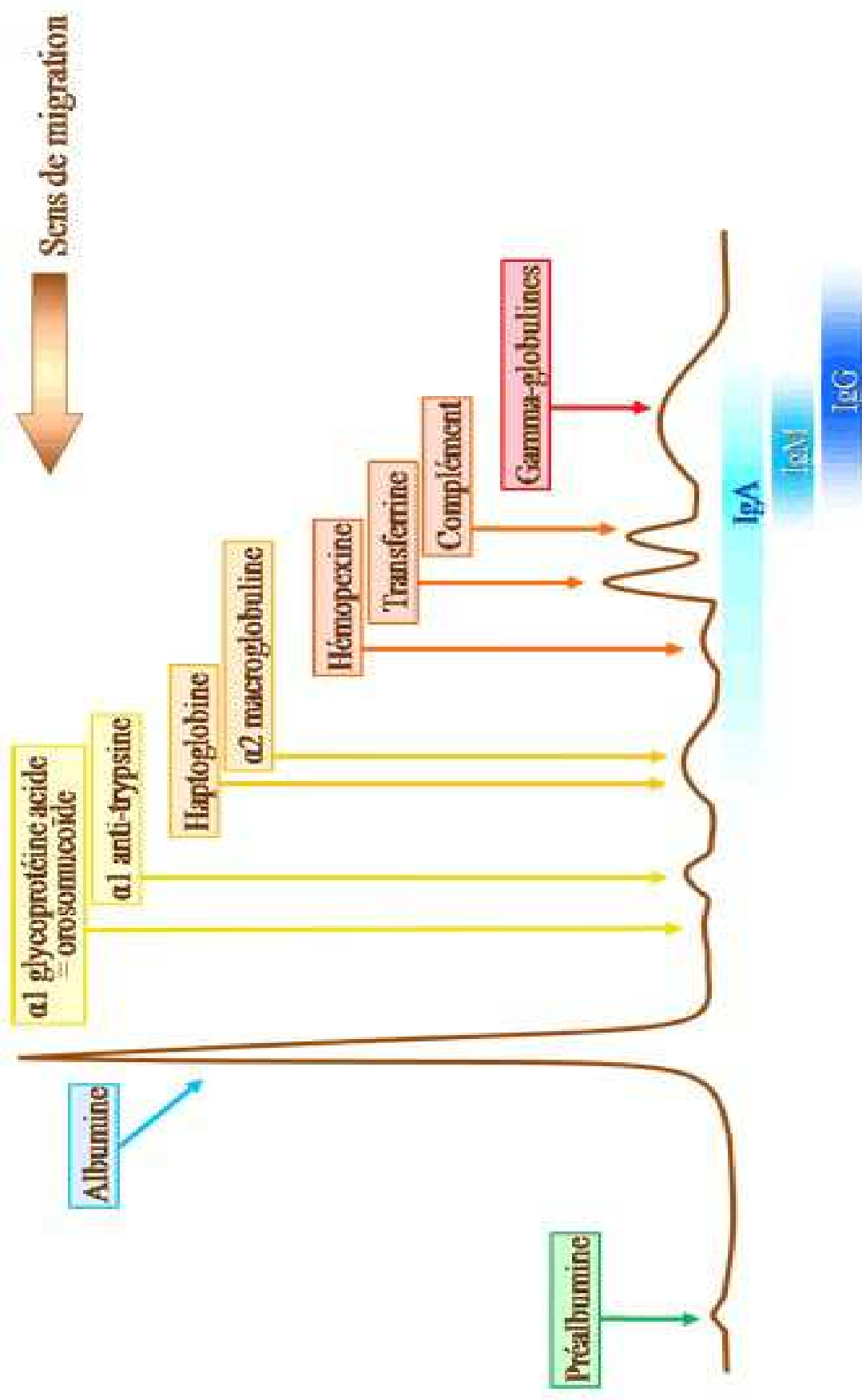
Fractionnement par électrophorèse

Zone :	Protéines :
Alb: ~ 60%	<ul style="list-style-type: none">- Préalbumine et Albumine
α -1: ~4%	<ul style="list-style-type: none">- α-1AT : 1.3g/L- α-1 lipoprotéines- α-1 glycoprotéine ou ORO
α -2: ~8%	<ul style="list-style-type: none">- α-2 macroglobuline- Haptoglobuline- Céruloplasmine
β : ~12%	<ul style="list-style-type: none">- β-lipoprotéines (LDL)- Transferrine- Hémoexine- C3 et C4-
γ : ~16%	<ul style="list-style-type: none">- Fibrinogène (si plasma)- Ig G, A, M, D, E



Remarque :

- Le fibrinogène migre en β (une bande proche du point de dépôt), il peut apparaître sur l'électrophorèse si un anticoagulant est utilisé.
- En cas d'hémolyse, on peut observer un pic d'hémoglobine migrant en β ou un pic d'hémoglobine liée à l'haptoglobine migrant en α_2 .



ELECTROPHORÈSE DE ZONE ET SES VARIANTES

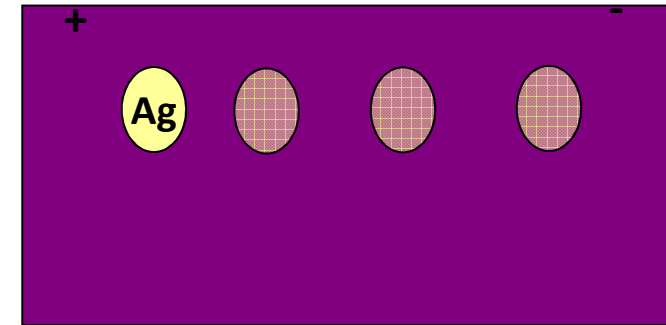
- *Electrophorèse sur acétate de cellulose* (séparation en fonction de la charge).
- *Electrophorèse sur gel de polyacrylamide* (séparation en fonction de la charge et du poids moléculaire).
- *Electrophorèse sur gel de polyacrylamide + SDS* (séparation en fonction de la masse molaire).

IMMUNOÉLECTROPHORÈSE

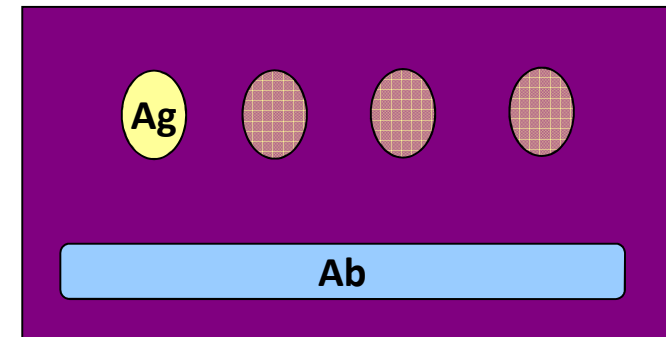
Technique basée sur une *double diffusion* en gel et permet *l'identification* des constituants d'un mélange grâce à 2 propriétés indépendantes:

- *Mobilité électrophorétique*
- *Spécificité antigénique.*

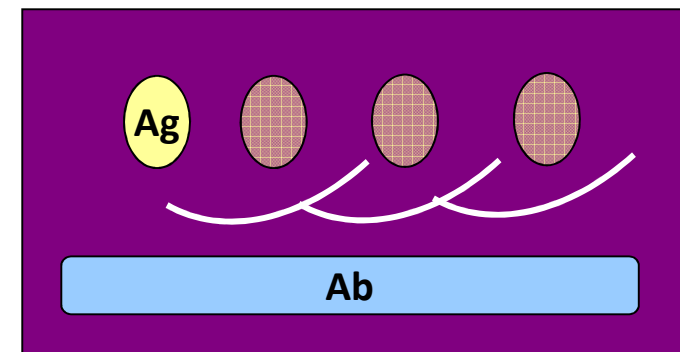
1- les molécules antigéniques sont séparées grâce à leur *différence de mobilité* dans un champ électrique.



2- lorsque la séparation est suffisante, un *antisérum* est placé dans une rigole parallèle au sens de migration des Ag.



3- Ag et Ab *diffusent* librement dans le gel et donnent des *arcs de précipitation*



IMMUNOFIXATION

- Détermination de la *nature* du ou des composants monoclonaux dans une GM et le *typage* de la chaîne légère associée à *l'immunoglobuline* éventuellement mise en évidence.
- C'est une *électrophorèse* des protéines en gel d'agarose, suivie d'une *immunoprécipitation in situ* des Ig avec des antisérums spécifiques de chaque isotope incubés à la surface du gel.
- Six pistes du même échantillon subissent l'électrophorèse puis cinq pistes sont recouvertes chacune d'un *immunosérum monospécifique* (anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-K, anti- λ), la dernière piste étant mise en contact avec un réactif fixateur des protéines pour servir de *référence*.

PROFIL PROTÉIQUE

Représentation graphique des dosages de plusieurs protéines exprimés en g/l ou mieux, en pourcentage de la normale.

Deux types de profils sont envisagés :

➤ *Un profil élargi, à 8 ou 10 protéines, dit d'orientation :*

Maximum d'informations biologiques utiles au diagnostic ou au dépistage de complications.

➤ *Un profil spécifique réduit à quelques protéines :*

Syndromes particuliers lorsque l'examen clinique est peu évocateur (fièvre prolongée inexplicquée, vitesse de sédimentation accélérée inexplicquée, altération de l'état général sans cause évidente, algies diffuses) .

N.B : le profil protéique est toujours accompagné d'une électrophorèse.

DYSPROTÉINÉMIE

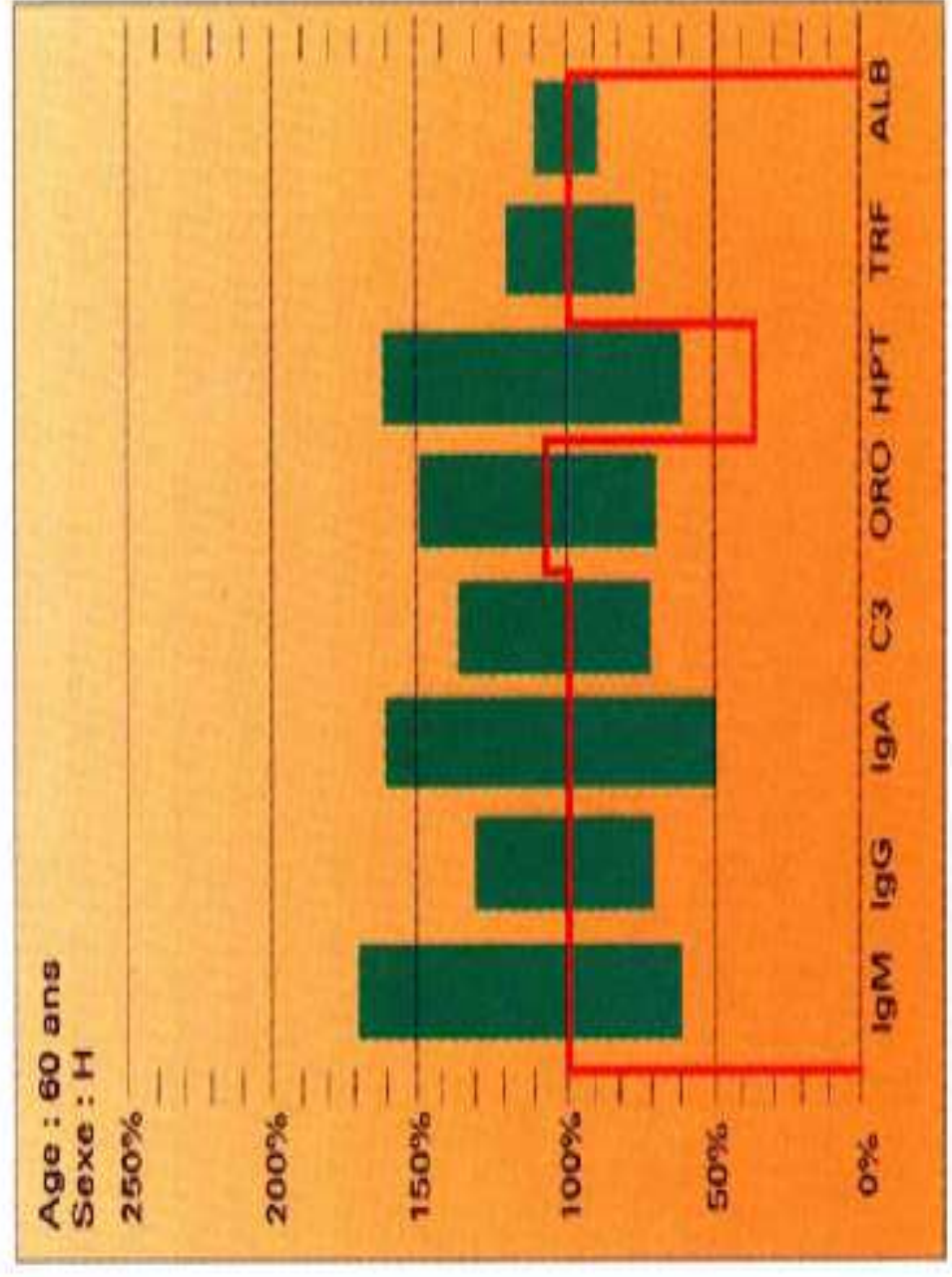
- Affections révélées par une perturbation de la concentration des protéines totales.
- Affections révélées par perturbation du profil électrophorétique.
- Affections révélées par les variations individuelles des différentes protéines plasmatiques.

VALEUR NORMALE ET VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES

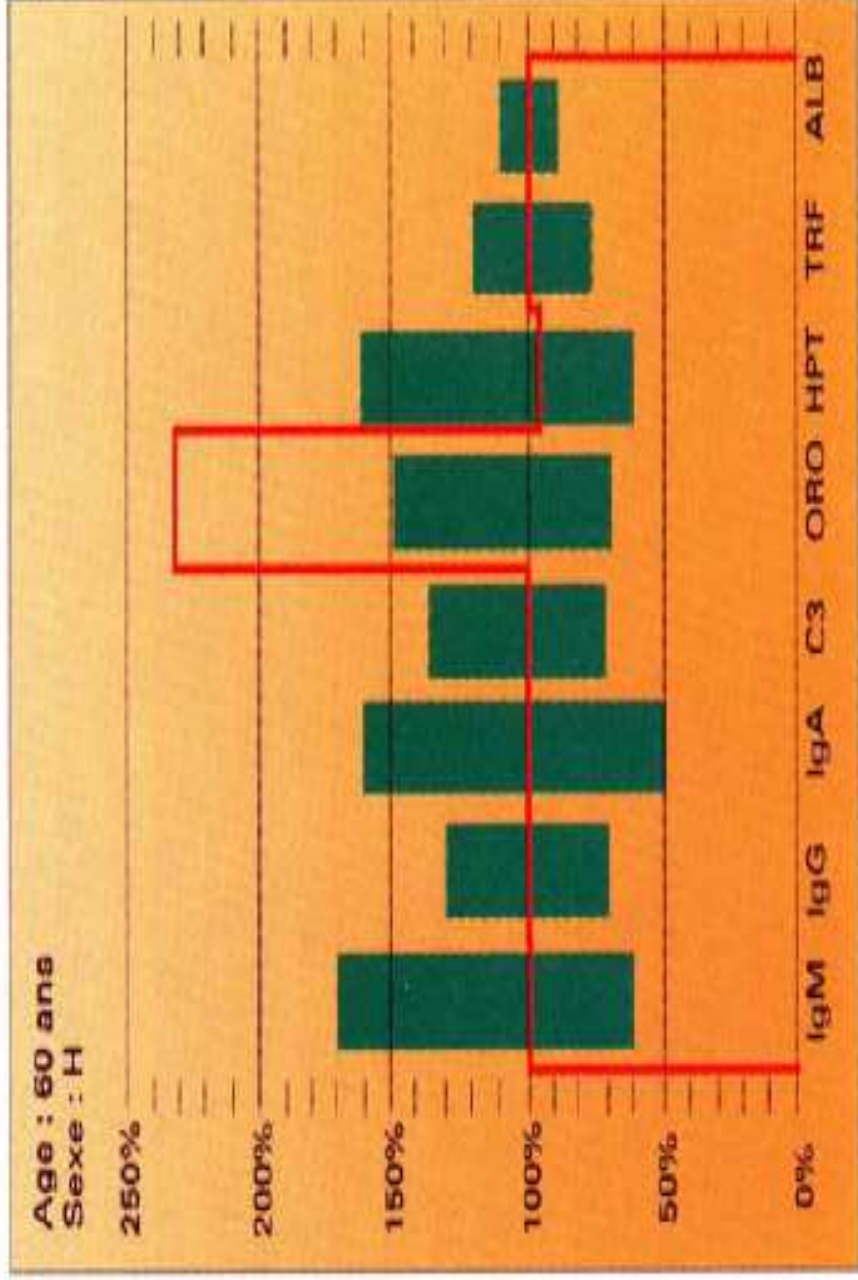
- *Valeur normale* chez l'adulte : 70g/l (60-80 g/l)
- *Variations avec l'âge:*
 - prématuré: 40g/l
 - nouveau-né: 60g/l, avec chute à 45-50g/l au bout de 4 jrs
 - nourrisson (2 ans): 60g/l
 - après 70 ans: 65g/l par \searrow de l'albumine et/ou des Ig
 - **grossesse**: 60g/l par hémodilution et diminution de l'albumine et/ou des Ig.

AFFECTIONS RÉVÉLÉES PAR PERTURBATION DU PROFIL ÉLECTROPHORÉTIQUE/ PROTÉIQUE

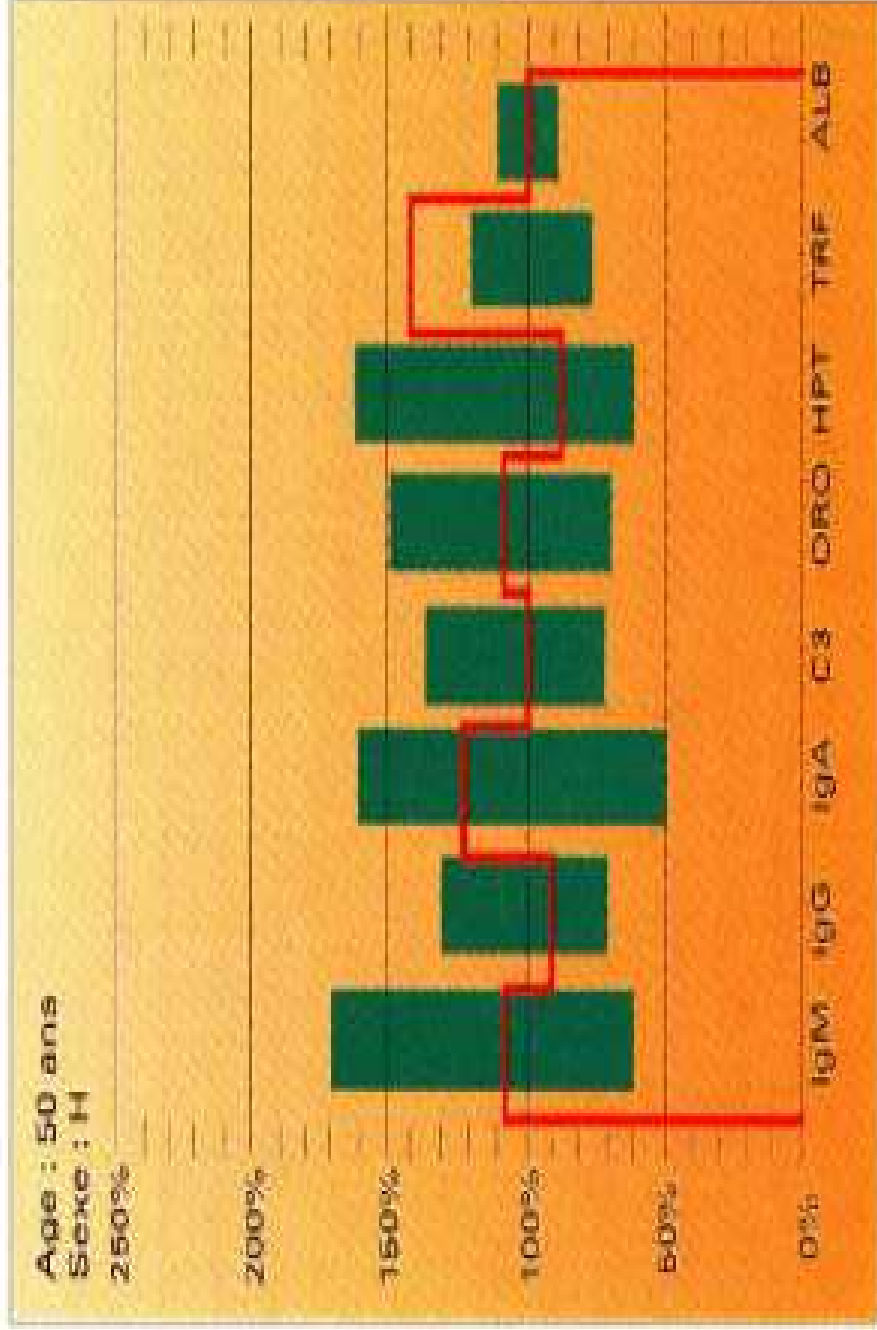
- Syndrome inflammatoire, aigue ou chronique
- Syndrome néphrotique
- Cirrhoses
- Gammopathies polyclonales et monoclonales
- Insuffisance hépatique
- Hémolyse
- Carences et surcharges en fer
- Dénutritions.
- Syndrome de fuite digestive....



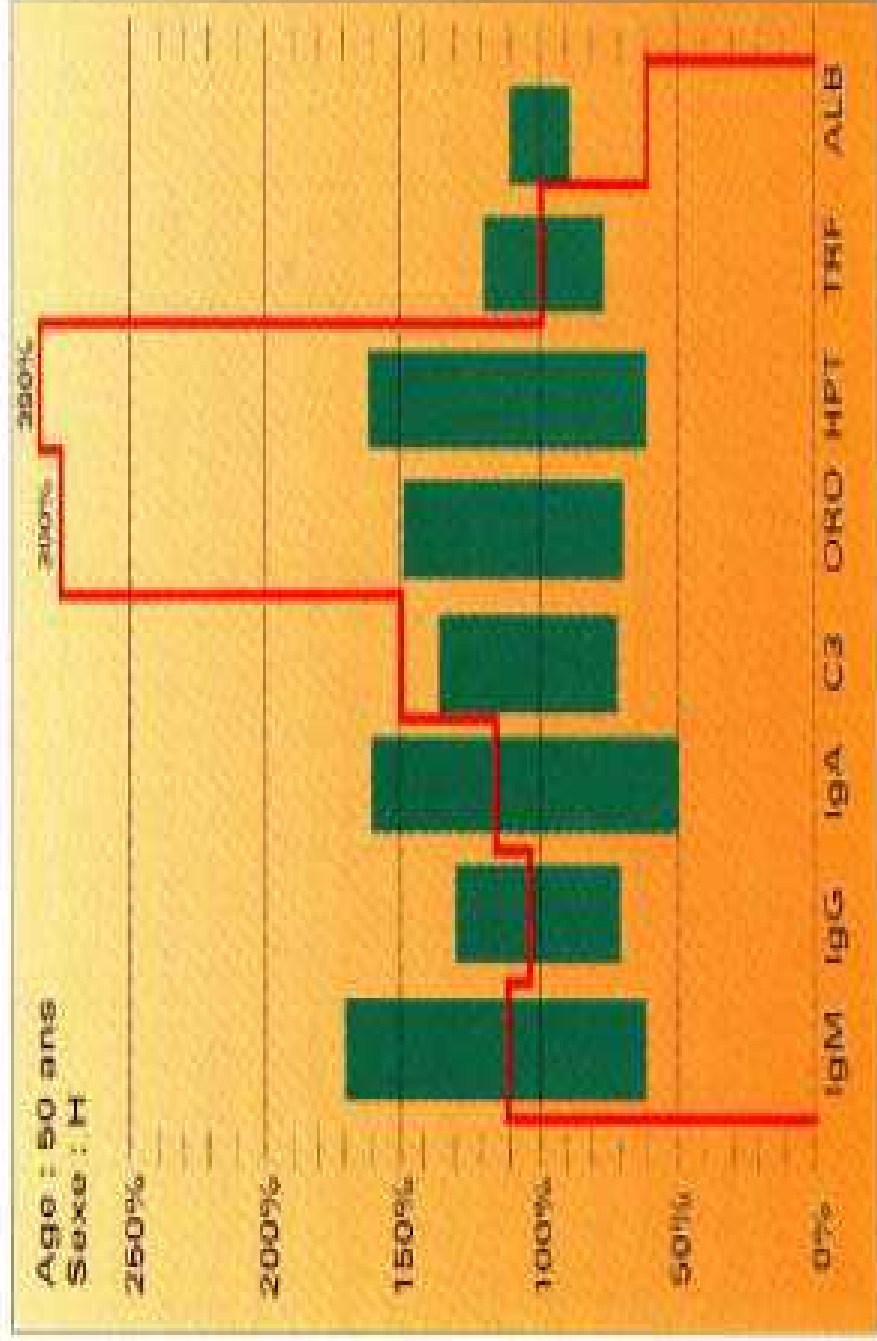
Hémolyse sans inflammation



Hémolyse avec inflammation

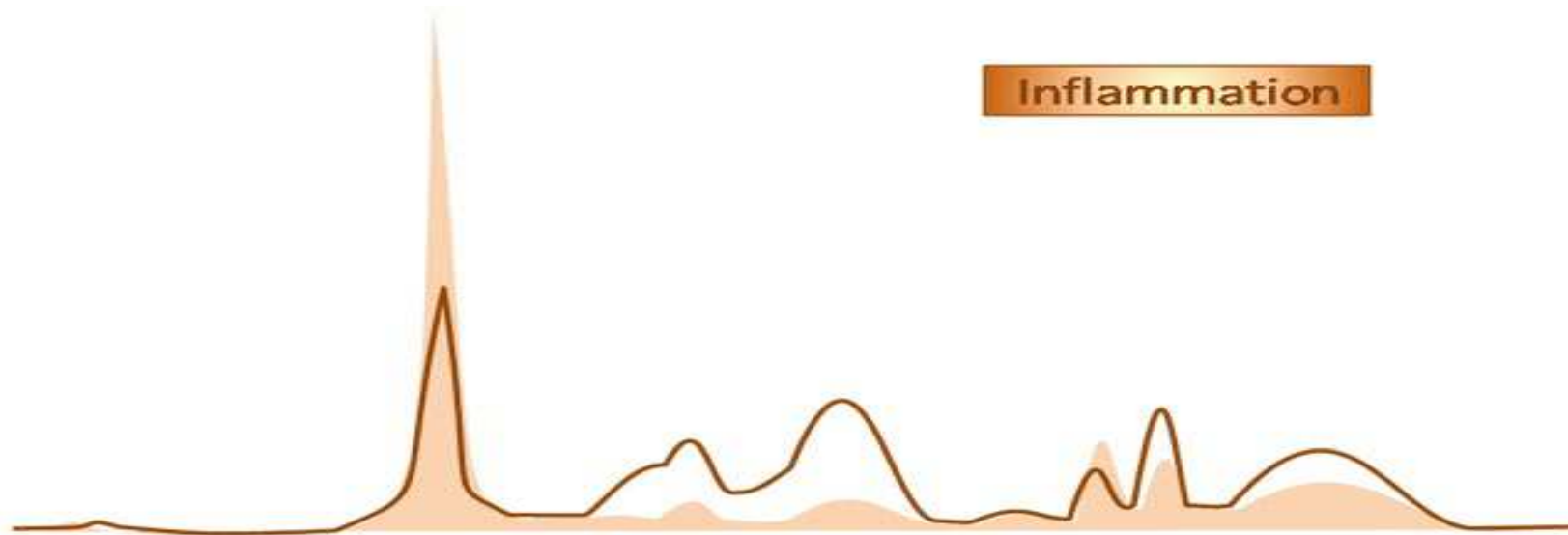


Carence en fer isolée



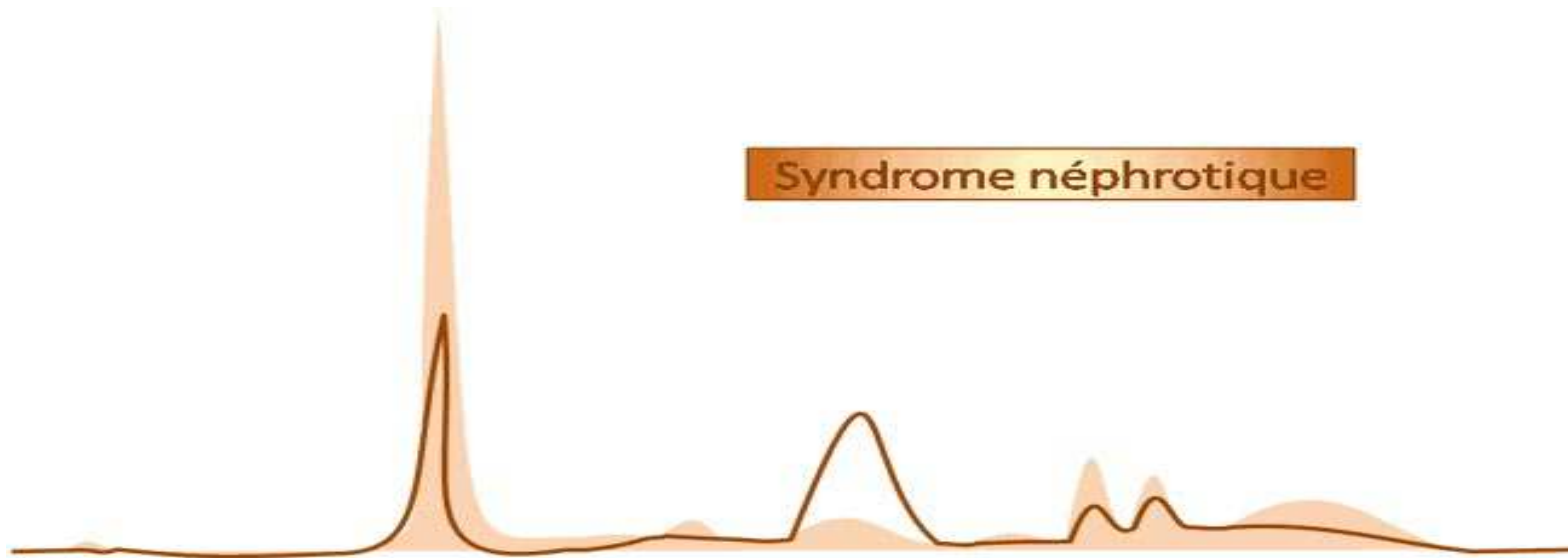
Carence en fer avec inflammation

SYNDROME INFLAMMATOIRE



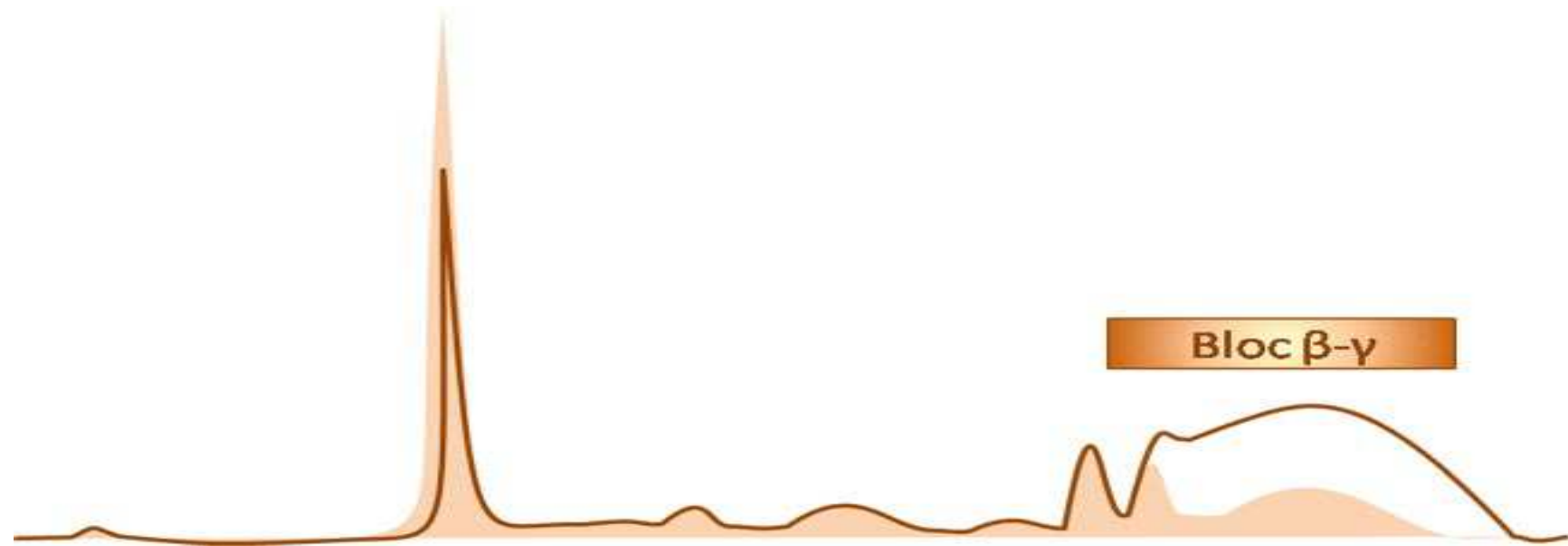
- *Inflammation aiguë*: augmentation des $\alpha 1$ ($\alpha 1$ antitrypsine, orosomucoïde) et $\alpha 2$ (haptoglobine)
- *Inflammation chronique*: augmentation des $\beta 2$ et γ globulines et diminution de l'albumine qui masque partiellement l'hyperprotidémie réactionnelle (taux normal des protéines totales)

SYNDROME NÉPHROTIQUE



- *Diminution* de l'albumine et de l'ensemble des globulines sauf α_2 macroglobuline et les lipoprotéines responsables d'un pic en α_2 .
- *L'hypoprotidémie* avec *l'hypoalbuminémie* provoquent l'abaissement de la pression oncotique et l'apparition d'oedèmes.

CIRRHOSE DÉCOMPENSÉE



Dans la cirrhose hépatique décompensée on note :

- Une *diminution* de l'albumine.
- Apparition d'un bloc β - γ caractéristique (augmentation des IgA " β " et des IgG, IgM " γ ").

LES GAMMAPATHIES



- Les hyperglobulinémies monoclonales se caractérisent par un pic étroit et aigu au niveau de la zone γ
- les hyperglobulinémies polyclonales se caractérisent par un dôme plus ou moins élevé au niveau de la zone γ .