



# **Remerciements**

*Nous remercions notre dieu miséricordieux de nous avoir amené à réaliser ce projet. Ce travail n'aurait pu voir le jour sans le soutien et l'aide de plusieurs personnes :*

## ***Dr TOUDERT. A, Maitre-assistant Hospitalo-Universitaire en Immunologie***

*Nous vous remercions vivement de nous avoir fait l'honneur de diriger ce travail sans ne jamais épargner aucun effort pour nous guider dans le chemin sinueux de la recherche. Sans votre Clairvoyance, vos corrections méticuleuses, ce travail n'aurait pu être préparé et dirigé dans des conditions favorables. Nous n'oublierons jamais la gentillesse et la disponibilité dont vous avez fait preuve en nous accueillant en toutes circonstances. Veuillez Chère Maître, trouvez dans ce travail l'expression de notre estime et nos sentiments les plus sincères. Qu'ALLAH vous protège et vous accorde santé, bonheur et prospérité à vous et à vos enfants.*

## ***Dr BELKAID. N, Maitre-assistante Hospitalo-Universitaire et Chef de service de Biochimie***

*Nous vous remercions vivement pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de ce travail. Nous portons une grande considération tant pour votre gentillesse et modestie, que pour votre sérieux et compétence professionnelle qui sont pour nous un exemple à suivre.*

*Veuillez trouver ici, Cher Maître, le témoignage de notre respect le plus profond et nos remerciements les plus sincères.*

## ***Dr SAMER K, Assistante Hospitalo-Universitaire en Biochimie***

*Permettez-nous de vous exprimer nos sincères remerciements. C'est un grand Honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce mémoire avec plaisir et sans conditions.*

*Que ce travail soit pour nous l'occasion de vous exprimer notre admiration ainsi que notre gratitude Veuillez croire, Chère Maître, en nos sentiments les plus respectueux*

## ***Dr BELAID S, Assistante Hospitalo-Universitaire en hémobiologie***

*Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger ce mémoire. Veuillez trouver dans ce travail, l'expression de notre considération et gratitude et de notre profond respect.*

*Que ce travail soit pour nous l'occasion de vous exprimer notre admiration ainsi que notre gratitude Veuillez croire, Chère Maître, en nos sentiments les plus respectueux*

*A cœur vaillant rien d'impossible  
A conscience tranquille tout est accessible  
Espérant des lendemains épiques  
Un avenir glorieux et magique  
Souhaitant que le fruit de nos efforts fournis  
nous mènera vers le bonheur fleuri  
Aujourd'hui, ici rassemblés auprès des jurys,  
Nous prions dieu que cette soutenance  
Fera signe de persévérance  
Et que nous serions enchantés  
Par notre travail honoré*

## **Dédicaces**

*C'est avec un grand plaisir et une immense fierté et joie que je dédie ce travail :*

### ***A ma très chère mère***

*Quoi que je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Si je suis arrivée là c'est bien grâce à toi, qu'Allah te donne une longue vie et te protège pour moi. Merci pour ton soutien et ton amour. Maman je t'aime.*

### ***A mon très cher père***

*Signe de fierté et d'honneur. Que ce travail témoigne de mon respect, ma Profonde gratitude pour toutes ces années de sacrifice pour moi et de mon grand amour pour toi. Merci pour ta confiance. Papa je t'aime.*

### ***A mon Mari KAMEL***

*Aucun mot ne saurait t'exprimer mon profond attachement et ma reconnaissance pour l'amour, la tendresse et la gentillesse dont tu m'as toujours entouré. Cher mari j'aimerai bien que tu trouves dans ce travail l'expression de mes sentiments de reconnaissance les plus sincères car grâce à ton aide et à ta patience avec moi que ce travail a pu voir le jour.*

*Que dieu le tout puissant nous accorde un avenir meilleur*

### ***A mes chers et adorable frères et sœur Lyes, Yassine et Kahina***

*En souvenirs des meilleurs moments que nous avons partagés. Pour toute la complicité et l'entente qui nous unis, ce travail est un témoignage de mon attachement et de mon amour. Que dieu vous protège*

*A toute ma famille*

*Qui m'entoure de toute son affection et sur laquelle je peux toujours compter.*

### ***À MES AMIES DE TOUJOURS : Mélissa et Djoudjou***

*En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble durant ces 6 années.*

*Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.*

*A tous ceux que je n'ai pas cités et qui comptent pour moi, merci de m'avoir accompagné jusqu'ici et d'être là pour la suite.*

***Yasmina***

## *Dédicaces*

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut .....*

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect et la reconnaissance.....*

*Aussi, c'est tout simplement que Je **dédie ce mémoire** à :*

***Allah Tout puissant** Qui m'a inspiré qui m'a guidé dans le bon chemin je lui dois ce que je suis devenue remerciements pour sa clémence.*

***Ma très chère mère** : Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.*

***A la mémoire de mon père** : Qui a été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je te dédie aujourd'hui ma réussite. Que Dieu, le miséricordieux, t'accueille dans son éternel paradis.*

***A mon beau père** : Veuillez trouver dans ce travail, le témoignage de mes sentiments les plus chères que j'ai pour vous, merci d'être présent pour m'encourager et me soutenir et de croire en mes projets.*

*Que dieu vous protège et vous accorde une vie pleine de joie et de bonheur et de prospérité.*

***A Lylia et son Mari Yazid** : Que ce travail soi pour moi l'occasion de vous exprimer mon amour et mon attachement, vous m'avez épaulé au moment les*

*plus dures, vous m'avez toujours soutenu et supporter, je vous dédie ce travail avec l'expression de mon amour et ma gratitude.*

*Que dieu vous accorde bonne santé, bonheur et prospérité a vous et à vos enfants.*

**Lydia et Sarah :** *Je vous dédie ce travail, en témoignage de mon amour de mon affection, je vous remercie vivement pour votre soutien et encouragement tout au long de ce travail.*

*J'espère avoir été à la hauteur de votre estime et que ce travail soit un témoignage de mes sentiments les plus chères que j'ai pour vous.*

*Que dieu vous protège et vous offre un avenir prospère.*

**Ammar-Malek :** *que j'aime beaucoup je vous dédie ce travail en preuve de mon amour et de ma tendresse envers vous.*

*Que dieu le tout Puissant, vous accorde un brillant avenir, longue vie, prospérité et bonheur.*

**Yasmina et djoudjou :** *Ce travail est le fruit d'une longue période de patience et d'efforts que nous avons partagée ensemble.*

*Que ce travail soi un gage de nos liens les plus solidaires, et pour moi l'occasion de vous exprimer mon respect et mon affection.*

*Je vous souhaite beaucoup de sucées dans votre vie professionnelle et familiale, et surtout beaucoup de joie et de bonheur.*

**A tous ceux que j'aime :** *A tous mes amis, a tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.*

**MELISSA**

# Dédicaces

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut .....*

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect et la reconnaissance....*

*Aussi, c'est tout simplement que **Je dédie ce mémoire à :***

**Allah** *Tout puissant Qui m'a inspiré qui m'a guidé dans le bon chemin je lui dois ce que je suis devenue remerciements pour sa clémence.*

## **A ma très chère Mère Ouerdane Zeina**

*Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que je prouve pour toi. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. Ton encouragement était la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments pénible, de solitude et de souffrance, où l'on a terriblement besoin d'un petit mot, d'un petit geste, aussi humble soit-il, de soutien moral.*

*En ce jour mémorable pour moi et aussi pour toi reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières.*

*Je prie Dieu le tout puissant de te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.*

## **A Mon très cher père Arezki**

*En ce jour de ma soutenance aucun mot, aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste valeur l'ampleur de l'amour l'attachement, la reconnaissance, et l'admiration que j'éprouve pour toi. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite.*

*Ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir.*

*Je suis fière et contente de réaliser une partie de ce que vous avez tant espéré et attendu de moi toi et yema vous avez été présent pour moi tout au long de mes études et j'espère que j'ai été à la hauteur de vos espérances.*

*Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, longue vie, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.*

**A Mes très chère sœurs Sara et Yasmine, Imane, Meriem et Dihouche**

*Ces quelques lignes ne sauront exprimer toute l'affection et l'amour que je vous porte, et en témoignage des profonds liens qui nous unissent, pour l'intérêt que vous portez à ma vie, J'espère avoir été à la hauteur de votre estime et que ce travail soit un témoignage de mes sentiments les plus sincères et les plus affectueux que j'ai pour vous.*

*Que Dieu vous protège et vous accorde un brillant avenir avec une vie pleine de joie, de bonheur et de succès.*

**A mon grand père Abdelkader, mes grandes mères,**

**à mes oncles et tantes et toute ma famille**

*En témoignage de mon profond amour, mon grand attachement et ma tendresse*

*J'espère avoir été à la hauteur de votre estime et que ce travail soit un témoignage de mes sentiments les plus chers que j'ai pour vous*

*Que dieu vous protège, vous accorde bonne santé et longue vie.*

**A mes chères copines Yasmina et Mélissa**

*Toutes les expressions aussi descriptibles qu'elle soient, ne pourraient témoigner l'affection et les sentiments d'amour que je vous porte.*

*Je suis honorée d'avoir des amies comme vous.*

*Nous avons partagé les bons et les mauvais moments durant toute notre période d'étude supérieure des moments de fou rires de selfie de bonheurs mais aussi des moments de stress de déroutage et de peur, pour ma part j'ai vécu avec vous les plus belle heures et journée de ma vie et je souhaite que notre amitié perdure.*

*Que dieu vous bénisses et vous offre un avenir prospère.*

***A tous ceux que j'aime.....***

*A tous mes amis, a tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.*

**QLF**

***Je donne tellement d'amour aux miens que je n'en ai plus pour les autres.***

***Que pour La famille, je n'ai dieu que pour eux.***

***Djoudjou***

# SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	v
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux .....	ix
Liste des graphes .....	x

Introduction .....	1
--------------------	---

## PARTIE THEORIQUE

### CHAPITRE I: L'ELECTROPHORESE DES PROTEINES SERIQUES

1. GENERALITES SUR L'ELECTROPHORESE DES PROTEINES SERIQUES .....	4
1.1 Définition.....	4
1.2 Principe général de l'électrophorèse des protéines.....	4
1.3 Les différents types de l'électrophorèse des protéines sériques .....	6
1.3.1 Électrophorèse en veine liquide .....	6
1.3.2 Électrophorèse de zones .....	6
1.3.3 L'électrophorèse capillaire .....	9
1.4 Indication de l'électrophorèse des protéines sériques .....	11
2. LES PROTEINES SERIQUES .....	11
2.1 Définition.....	11
2.2 Les principales protéines sériques .....	13
2.2.1 Groupe des albumines .....	13
2.2.2 Groupe des globulines .....	16
2.2.3 Groupe des gammaglobulines .....	22
3. PROFILS ELECTROPHORETIQUES.....	24
3.1 Protidémie.....	24
3.2 Variations de la protidémie.....	24
3.2.1 Les Hyper protidémies .....	24
3.2.2 Les Hypo protidémies .....	25
3.3 L'interprétation du profil électrophorétique d'un sérum humain normal.....	25
3.4 Interprétation illustrée des principaux profils électrophorétiques pathologiques.....	26

3.4.1	Bisalalbuminémie.....	26
3.4.2	Le syndrome inflammatoire .....	27
3.4.3	Syndrome néphrotique .....	29
3.4.4	Bloc bêta gamma.....	29
3.4.5	Les Anomalie des gammaglobulines.....	30

## CHAPITRE II:LES INTERFERENCES ANALYTIQUES EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DES PROTEINES SERIQUES

1.	Hémolyse.....	33
1.1	Généralités.....	33
1.2	Mécanisme d'interférence de l'hémolyse.....	34
1.2.1	Mécanismes d'interférences sur les paramètres biochimiques.....	35
1.2.2	Mécanisme d'interférence sur l'électrophorèse capillaire des protéines sériques .....	36
2.	Le fibrinogène .....	37
2.1	Généralités .....	37
1.1.	Variations physiologiques et pathologiques du taux de fibrinogène .....	37
2.2	Rôles .....	37
2.3	Mécanisme d'interférence du fibrinogène sur l'électrophorèse capillaire des protéines sériques .....	38
3.	Bilirubine.....	38
3.1	Définition.....	38
3.2	Le métabolisme normal de la bilirubine .....	39
3.3	Variations pathologiques et physiologiques de la bilirubine.....	40
3.3.1	Variations pathologiques.....	40
3.3.2	Variations physiologiques .....	41
3.4	L'interférence de la bilirubine sur l'électrophorèse capillaire des protéines sériques .....	41
4.	Autres interférences sur l'électrophorèse capillaire .....	42
4.1	Interférence d'origine endogène .....	42
4.1.1	L'hyperlipémie .....	42
4.1.2	Anticorps anti-animaux .....	43
4.2	Interférence d'origine exogène .....	43
4.2.1	Produits de contraste .....	43
4.2.2	Antibiotiques et antifongiques .....	43

4.2.3 Produits de remplissage.....	44
------------------------------------	----

## PARTIE PRATIQUE

1. Type de l'étude.....	46
2. Période et lieu de l'étude.....	46
3. Matériels et Méthodes.....	46
3.1 Matériels.....	46
3.1.1 Matériels biologiques.....	46
3.2 Méthodes.....	48
3.2.1 Étude de l'interférence de l'hémolyse sur l'électrophorèse capillaire des protéines sériques.....	48
3.2.2 Étude de l'interférence du fibrinogène sur l'électrophorèse capillaire des protéines sériques.....	50
3.2.3 Étude de l'interférence de la bilirubine sur l'électrophorèse capillaire des protéines sériques.....	52

## RESULTATS ET DISCUSSION

1. Analyse statistique.....	55
2. Vérification de la normalité de la distribution des variables.....	55
3. Interférence de l'hémolyse sur l'électrophorèse capillaire des protéines sériques.....	57
3.1 Analyse quantitative.....	57
3.2 Analyse qualitative.....	60
4. Résultats de l'étude de l'interférence du fibrinogène sur l'électrophorèse des protéines sériques.....	64
4.1 Analyse quantitative.....	64
4.2 Analyse qualitative.....	66
4.3 Etude de corrélation des moyennes sérum/plasma.....	67
5. Résultats de l'étude de l'interférence de la bilirubine sur l'électrophorèse des protéines sériques.....	70
5.1 Analyse quantitative.....	70
5.2 Analyse qualitative.....	71
Discussion.....	74
Conclusion et Recommandations.....	79

Bibliographie

Annexes

# Abréviations

**Ac:** Anticorp

**ADN :** Acide DesoxyriboNucleique

**Ag :** Antigène

**ALB :** Albumine

**ARN :** Acide RiboNucléique

**ASAT :** Aspartate Amino Transférase

**ATP :** Adénosine TriPhosphate

**BGT :** Bilirubine-GlucuronosylTransférase

**BL :** Bilirubine Libre

**BNC :** Bilirubine Non Conjuguée

**[C] :** Concentration

**CK :** Créatine Kinase

**EC :** Electrophorèse Capillaire

**EP :** Electrophorèse

**EPP :** Electrophorèse Des Protéines

**G6PD :** Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase

**GR :** Globule Rouge

**HAAAs :** Human Anti-Animal Antibodies

**HAMAs :** Human Anti-Mouse Antibodies

**Hb:** Hémoglobine

**Hp:** Haptoglobine

**IF** :Immunofixation

**Ig** :Immunoglobuline

**IgM** :Immunoglobuline M

**IgD**:Immunoglobuline D

**IgE** :Immunoglobuline E

**IgA** :Immunoglobuline A

**IgG** :ImmunoglobulineG

**KD** :kilo Dalton

**LDH** :Lactate Deshydrogénase

**LDL** :Low Density Lipoprotein

**M** :Monoclonale

**MGUS** :Monoclonal Gammopathy Of Undetermined Significance

**pHi** : potentiel Hydrogèneisoélectrique

**PM** : Poids Moléculaire

**PRI +** :Protéines de la Réaction Inflammatoire

**r** : Coefficient de corrélation

**R<sup>2</sup>** : Coefficient de détermination

**RBP** : RetinolBinding Protein

**SPS** : Spark plasma sintering

**t** : tours

**T3** : Tri-iodothyronine 3

**T4** :Thyroxine 4

**TBPA** : ThyroxineBinding Pré-Albumine

**TP** : Taux De Protides

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Les différents paramètres agissant sur la migration des particules lors de l'électrophorèse [5].	5
<b>Figure 2 :</b> Représentation d'une électrophorèse sur papier.	7
<b>Figure 3 :</b> Représentation d'une électrophorèse sur acétate de cellulose.	8
<b>Figure 4 :</b> Représentation d'une électrophorèse horizontale sur gel d'agarose et une électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide.	9
<b>Figure 5 :</b> Principe d'un système d'électrophorèse capillaire [9].	10
<b>Figure 6 :</b> Représentation du principe de l'électro-endosmose.	10
<b>Figure 7 :</b> Profil électrophorétique des différentes fractions des protéines sériques.	12
<b>Figure 8:</b> Représentation schématique d'une immunoglobuline.	23
<b>Figure 9:</b> Protéinogramme sérique normal et identification des fractions protéiques en électrophorèse capillaire sur Capillarys ® Sebia.	25
<b>Figure 10:</b> Profil électrophorétique d'une bisalbuminémie.	27
<b>Figure 11:</b> Profil électrophorétique d'un syndrome inflammatoire aigu.	28
<b>Figure 12 :</b> Profil d'un syndrome inflammatoire chronique.	28
<b>Figure 13:</b> Profil électrophorétique d'un syndrome néphrotique.	29
<b>Figure 14:</b> Bloc bêta gamma.	30
<b>Figure 15:</b> Profil électrophorétique d'une Hypogammaglobulinémie.	30
<b>Figure 16 :</b> Profil électrophorétique d'une gammopathie monoclonale et polyclonale.	31
<b>Figure 17 :</b> Profils électrophorétiques avant et après hémolyse.	36
<b>Figure 18:</b> Métabolisme de la bilirubine (Dr A. Cortey).	40
<b>Figure 19 :</b> Profil électrophorétique d'un sérum ictérique.	42
<b>Figure 20 :</b> Automate CAPILLARYS ® 2 FLEX PIERCING (SEBIA)	46
<b>Figure 21:</b> Automate ARCHITECT CI 4100 ABBOTT ®	47

<b>Figure 22</b> : Centrifugeuse HETTICH UNIVERSEL 320 ®.....	47
<b>Figure 23</b> : Représentation d'un sérum non hémolysé et d'un sérum hémolysé.....	49
<b>Figure 24</b> : Schéma récapitulatif de la méthode d'étude de l'interférence de l'hémolyse. ....	50
<b>Figure 25</b> : Représentation d'un tube hépariné et d'un tube sec .....	51
<b>Figure 26</b> : Schéma récapitulatif de la méthode d'étude de l'interférence du fibrinogène. ....	52
<b>Figure 27</b> : Schéma récapitulatif de la méthode d'étude de l'interférence de la bilirubine.....	53
<b>Figure 28</b> : Tracé électrophorétique obtenu sur sérum hémolysé montrant une déformation de la fraction alpha 2.....	61
<b>Figure 29</b> : Profil électrophorétique obtenue sur sérum hémolysé montrant une élévation de la fraction beta 1.....	62
<b>Figure 30</b> : Profil électrophorétique du patient présentant un pic d'allure monoclonale. ....	63
<b>Figure 31</b> : Les résultats de l'immunotypage effectué sur le sérum du patient. ....	63
<b>Figure 32</b> : Profil électrophorétique d'un sérum (1), d'un plasma avant (2) et après traitement à l'éthanol(3). ....	66
<b>Figure 33</b> : Tracé électrophorétique représentant une anomalie en pré albumine.....	71
<b>Figure 34</b> : Représentation d'un tracé électrophorétique avant et après photodégradation. ...	72

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Les différentes fractions des protéines sériques.....	12
<b>Tableau 2</b> :Pourcentage et concentration normales de différentes fractions des protéines sériques.....	26
<b>Tableau 3</b> : Matériel et réactifs utilisé lors de l'étude.....	48
<b>Tableau 4</b> : Valeur p des différents variables calculés par le test de shapiro wilk.....	56
<b>Tableau 5</b> : Comparaison de la moyenne du taux de protides et des fractions des profils électrophorétiques obtenus sur sérum clair et sur sérum hémolysé.....	57
<b>Tableau 6</b> : Répartition de différentes anomalies observées sur les tracés EP hémolysé.....	60
<b>Tableau 7</b> : Résultats de la comparaison de la moyenne des différentes fractions entre les trois tubes.....	64
<b>Tableau 8</b> : Coefficient de corrélation entre les fractions obtenues sur sérum et celle obtenues sur plasma avant traitement à l'éthanol.....	67
<b>Tableau 9</b> : Comparaison des moyennes des différentes fractions avant et après photodégradation.....	70

## Liste des graphes

<b>Graphe 1:</b> Comparaison des moyennes des Taux de protides obtenues sur sérum clair et sur sérum hémolysé.....	58
<b>Graphe 2:</b> Comparaison des moyennes d'albumine obtenues sur sérum clair et sur sérum hémolysé.....	58
<b>Graphe 3 :</b> Comparaison des moyennes de la fraction alpha2 obtenues sur sérum clair et sur sérum hémolysé.....	58
<b>Graphe 4 :</b> Comparaison des moyennes de la fraction alpha 1 obtenues sur sérum clair et sur sérum hémolysé.....	58
<b>Graphe 5 :</b> Comparaison des moyennes de la fraction beta 2 obtenues sur sérum clair et sur sérum hémolysé.....	59
<b>Graphe 6 :</b> Comparaison des moyennes de la fraction beta 1 obtenues sur sérum clair et sur sérum hémolysé.....	59
<b>Graphe 7 :</b> Comparaison des moyennes de la fraction gamma obtenues sur sérum clair et sur sérum hémolysé.....	59
<b>Graphe 9 :</b> Représentation des moyennes de la fraction alpha 1 sur sérum, plasma avant et après traitement à l'éthanol .....	65
<b>Graphe 10 :</b> Représentation des moyennes de l'albumine sur sérum, plasma avant et après traitement à l'éthanol .....	65
<b>Graphe 11 :</b> Représentation des moyennes de la fraction alpha 2 sur sérum, plasma avant et après traitement à l'éthanol .....	65
<b>Graphe 12 :</b> Representation des moyennes de la fraction $\beta$ 1 sur sérum, plasma avant et après traitement à l'éthanol.....	65
<b>Graphe 13:</b> Représentation des moyennes de la fraction $\gamma$ sur sérum, plasma avant et après traitement à l'éthanol.....	66

<b>Graphe 14:</b> Représentation des moyennes de la fraction beta 2 sur sérum, plasma avant et après traitement à l'éthanol .....	66
<b>Graphe 15 :</b> Corrélation des moyennes de la fraction alpha1 sur sérum / plasma. ....	68
<b>Graphe 16 :</b> Corrélation des moyennes de l'albumine sur sérum / plasma.....	68
<b>Graphe 17 :</b> Corrélation des moyennes de la fraction beta1 sur sérum / plasma. ....	68
<b>Graphe 18 :</b> Corrélation des moyennes de la fraction alpha2 sur sérum / plasma. ....	68
<b>Graphe 19:</b> Correlation des moyennes de la fraction beta2 sur sérum / plasma. ....	69
<b>Graphe 20:</b> Corrélation des moyennes de la fraction gamma sur sérum / plasma.....	69
<b>Graphe 21 :</b> Corrélation des moyennes de la fraction beta 2 sur sérum / plasma après traitement à l'éthanol. ....	69
<b>Graphe 22 :</b> Représentation des moyennes de la fraction supplémentaire avant et après photodégradation. ....	72

# Introduction générale

## INTRODUCTION GENERALE

---

L'électrophorèse des protéines sériques est devenue de nos jours un examen complémentaire de grande importance, très utile pour le diagnostic et le suivi thérapeutique de nombreuses pathologies [1]. Cette technique, pouvant être lancée par différentes méthodes (Acétate de cellulose, Gel d'agarose et la méthode capillaire automatisée), permet de séparer les différentes protéines sanguines, apportant ainsi de nombreux renseignements, en particulier sur l'état inflammatoire, nutritionnel, infectieux et permet le dépistage et le suivi des gammopathies monoclonales [2].

Actuellement l'électrophorèse des protéines sériques est devenue systématique dans le bilan d'entrée de plusieurs malades hospitalisés, Ce qui induit une augmentation significative de la demande de cette analyse.

Cependant, Comme toute méthode analytique de biologie médicale, cette technique peut être influencée par plusieurs interférences analytiques, affectant ainsi l'interprétation des profils électrophorétiques obtenus, ce qui pourrait être à l'origine de conséquences cliniquement significatives.

Ces interférences analytiques peuvent avoir plusieurs origines : En rapport avec un événement pré-analytique (Prélèvement traumatique, agitation excessive, centrifugation inadéquate...), elles peuvent être dues à la présence dans le sérum de substances endogènes (bilirubine, fibrinogène), ou bien liées à la présence de substances exogènes administrées au patient dans un but thérapeutique.

Parmi les interférences les plus rencontrées en pratique de laboratoire on peut citer l'hémolyse, le fibrinogène et l'interférence de la bilirubine.

De ce fait quelles sont les anomalies engendrées par ces trois interférences sur les profils électrophorétiques des protéines sériques obtenus par technique capillaire?, quelles sont les précautions à prendre en considération en interprétant un profil issu de sérum hémolysé, ictérique ?

Par ailleurs, peut-on utiliser les prélèvements sous anti coagulant (en l'occurrence l'héparinate de lithium), les tubes les plus utilisés en laboratoire de biochimie, en électrophorèse des protéines sériques ?

## **INTRODUCTION GENERALE**

---

### **Objectif principal**

Déterminer l'impact de trois interférences analytiques (hémolyse, fibrinogène et bilirubine) sur les profils électrophorétiques obtenu par technique capillaire.

### **Objectifs secondaires**

- ✚ Evaluer la possibilité d'effectuer des électrophorèses des protéines sur tube avec un anticoagulant (héparinate de lithium).
- ✚ Déterminer les précautions et les mesures à prendre lorsqu'on est confronté à ces cas.

# **PARTIE THEORIQUE**

**CHAPITRE I**  
**L'ELECTROPHORESE DES PROTEINES**  
**SERIQUES**

## **1. GENERALITES SUR L'ELECTROPHORESE DES PROTEINES SERIQUES**

### **1.1 Définition**

L'électrophorèse est une technique physicochimique qui sépare des constituants ionisés dans un champ électrique [3]. Elle permet la séparation des protéines sériques en fractions de mobilités différentes, avec obtention de leurs pourcentages relatifs. Couramment utilisée en pratique clinique, cette analyse reflète l'ensemble des protéines sériques [4]. Elle participe à l'établissement du diagnostic de certains cas d'inflammation, de cancers ou d'infection [2].

### **1.2 Principe général de l'électrophorèse des protéines sériques**

Les protéines sont des molécules amphotères. Elles possèdent à la fois des fonctions acides (groupement carboxylique : R - COOH) et basiques (groupement amine : R - NH<sub>2</sub>). Soumises à un champ électrique dans un tampon donné, les protéines (chargées) se déplacent à différentes vitesses qui résultent de plusieurs facteurs.

La mobilité électrophorétique qui est l'ensemble des mouvements des particules en suspension dans un liquide soumis à l'influence d'un champ électrique. Elle dépend de la charge et de la géométrie de la particule [3, 4].

La charge dépend du pH du milieu et du pHi de la molécule :

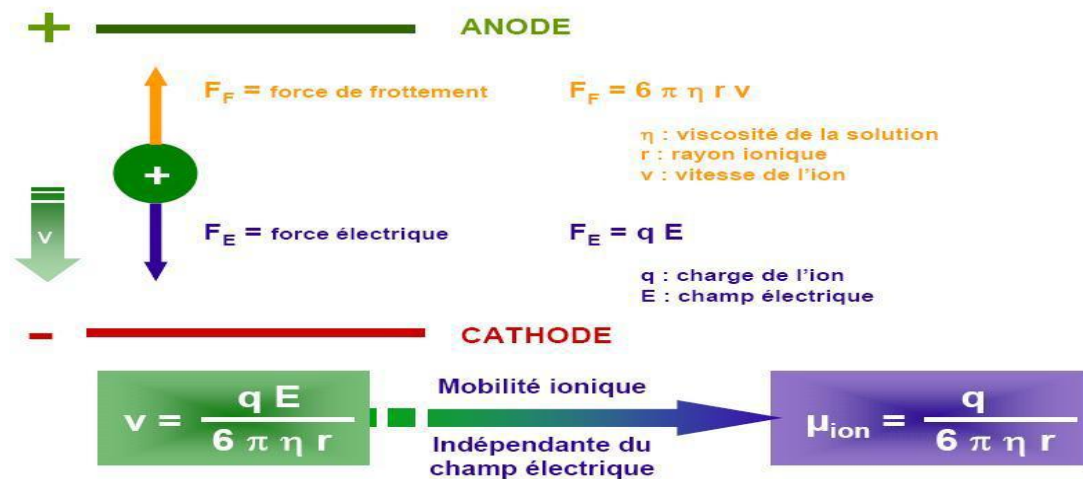
Au pH=pHi, la charge globale est nulle car les charges des extrémités N-terminale (amine) et C-terminale (acide carboxylique) ainsi que celles éventuellement présentes sur les chaînes latérales s'équilibrent.

Si pH < pHi, la charge globale est positive car la molécule a tendance à conserver des protons ou à en capter du milieu. (La molécule se déplace vers cathode).

Si pH > pHi, la charge globale est négative car la molécule a tendance à céder ses protons au milieu.

La mobilité d'une particule migrant dans un champ électrique uniforme est proportionnelle à sa charge, inversement proportionnelle à son rayon et à la viscosité du milieu (figure 1)

# CHAPITRE I : L'ELECTROPHORESE DES PROTEINES SERIQUES



**Figure 1:** Les différents paramètres agissant sur la migration des particules lors de l'électrophorèse [5].

- Le courant d'électroendosmose : Ce phénomène résulte de l'interaction entre la solution et la paroi en silice du capillaire. Cette paroi est tapissée de groupements silanols. Ces derniers se déprotonnent à pH supérieur à deux. Ceci conduit à un grand nombre de charges négatives au niveau de la paroi. Les cations de l'électrolyte viennent se placer à la surface de la silice et forment une double couche diffuse. Cette double couche de charges positives et négatives présente une différence de potentiel appelée potentiel électrocinétique ou potentiel zêta. Dès qu'on applique un champ électrique, les cations de la double couche se mettent en mouvement vers la cathode et entraînent les molécules électrolytiques de l'échantillon
- Le courant d'évaporation (effet joule) : Le courant électrique crée un échauffement et une perte de liquide par évaporation ; il s'ensuit l'apparition de courant liquidien perturbant la migration.
- La diffusion : Les particules incluses dans le gel ont tendance à diffuser des zones les plus concentrées vers les moins concentrées, perturbant la migration [6].
- La texture du support ou porosité (s'il y en a) :

Trois types de supports sont utilisés actuellement [6] :

- **Membranes d'acétate de cellulose**

Permet de séparer les protéines en 5 fractions et la révélation se fait par coloration au rouge ponceau ainsi que pour la séparation des différents types d'hémoglobines.

- **Gels d'agar et d'agarose**

Ils ont progressivement remplacé les précédents supports et ont amélioré l'électrophorèse de zones.

- **Gels à haute résolution : amidon ou polyacrylamide**

Ils font intervenir la filtration ou le tamisage moléculaire associés à la charge.

Essentiellement utilisés en recherche, ils permettent d'obtenir un très grand nombre de fractions et d'identifier les protéines.

## **1.3 Les différents types de l'électrophorèse des protéines sériques**

### **1.3.1 Électrophorèse en veine liquide**

La migration dans ce type d'électrophorèse s'effectue au sein d'un liquide de composition déterminée soumis à un champ électrique de courant continu.

Cette méthode permet la détermination des mobilités électrophorétiques des différents constituants d'un mélange, cependant elle est très coûteuse.

Appareillage : La mise en œuvre est longue et délicate. Les particules ne se séparent pas complètement mais ils se forment des frontières mises en évidence par des méthodes optiques telles que l'absorption ultra-violette pour les protéines [8].

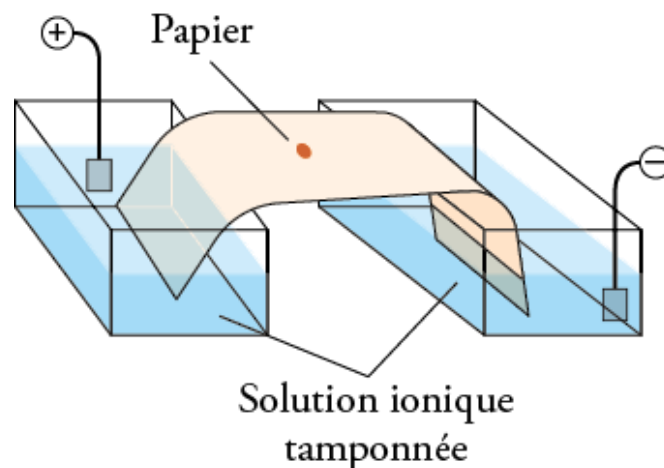
### **1.3.2 Électrophorèse de zone**

Les principales applications utilisent un support poreux stabilisant la phase liquide : on parle alors d'électrophorèse sur support ou d'électrophorèse de zones. Le mélange à séparer est déposé sur un support convenable, poreux et imprégné de tampon (papier, dérivés de cellulose, polyoside « agarose », polyacrylamide...). Le support doit être homogène, poreux et inerte. Cependant, la condition d'inertie n'est jamais respectée et le support joue un rôle plus ou moins important dans la séparation [9].

Les différents types d'électrophorèses de zones sont souvent nommés en fonction du type de support [9] :

### 1.3.2.1 Électrophorèse sur papier

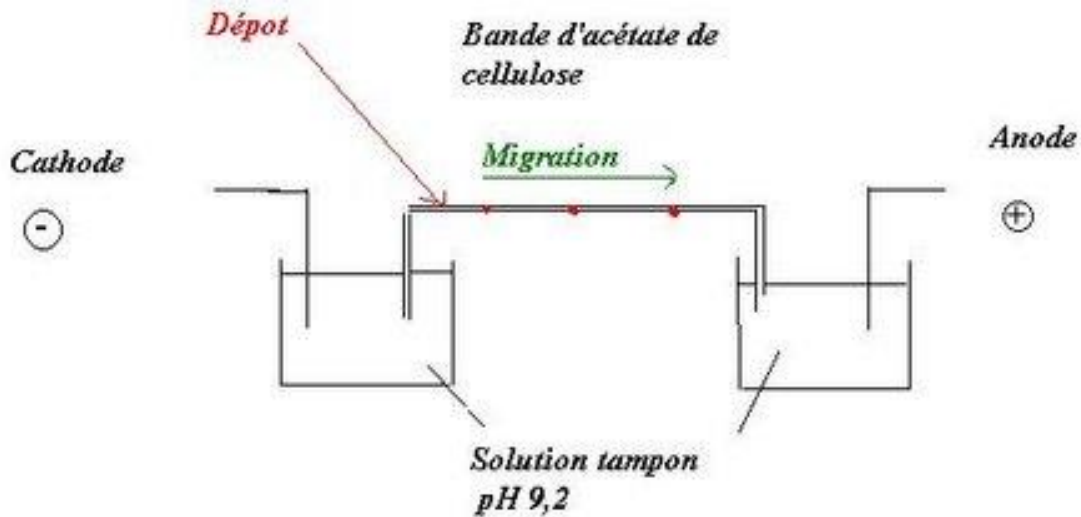
Assez peu résolutive, cette technique d'électrophorèse est surtout destinée à séparer des molécules de petite taille, dont les acides aminés. Des phénomènes d'interférence liés à la charge des acides aminés et de la cellulose du papier interviennent de façon notable. Une goutte de solution contenant l'échantillon à analyser est déposée sur une bande de papier, puis séchée. La bande de papier est humidifiée avec un tampon convenablement choisi, puis les deux extrémités de la bande sont plongées dans deux réservoirs contenant le tampon. Chaque réservoir est connecté à une électrode. Un champ électrique continu est appliqué, et les acides aminés se déplacent en fonction de leur charge nette. En fin d'électrophorèse, la bande de papier est séchée puis les acides aminés sont révélés par une réaction colorimétrique telle que celle à la ninhydrine.



**Figure 2 :** Représentation d'une électrophorèse sur papier.

### 1.3.2.2 Électrophorèse sur acétate de cellulose

L'électrophorèse se fait dans des conditions proches de celles de l'électrophorèse sur papier. Les bandes d'acétate de cellulose sont fragiles, mais elles limitent la diffusion des molécules à séparer. La révélation des protéines se fait également par une réaction colorimétrique. Cette technique, peu résolutive, permet de séparer grossièrement des groupes de protéines. Elle est peu coûteuse et permet une analyse rapide des protéines sériques.



**Figure 3** : Représentation d'une électrophorèse sur acétate de cellulose.

### 1.3.2.3 Électrophorèse sur gel d'amidon

L'électrophorèse sur gel d'amidon est particulièrement utile à l'analyse et à la séparation des isoenzymes. Le principe de la technique repose sur une séparation électrophorétique des protéines sur une matrice poreuse composée d'un gel d'amidon et d'un pH précis. Les enzymes présentes sont détectées en incubant le gel dans une solution contenant un substrat spécifique de l'enzyme donnant lieu à un produit coloré. Les profils obtenus sont désignés sous le nom de zymogrammes.

### 1.3.2.4 Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée en biochimie et en biologie moléculaire pour séparer les protéines, l'ADN, l'ARN en fonction de leurs poids moléculaires. Les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures [10].

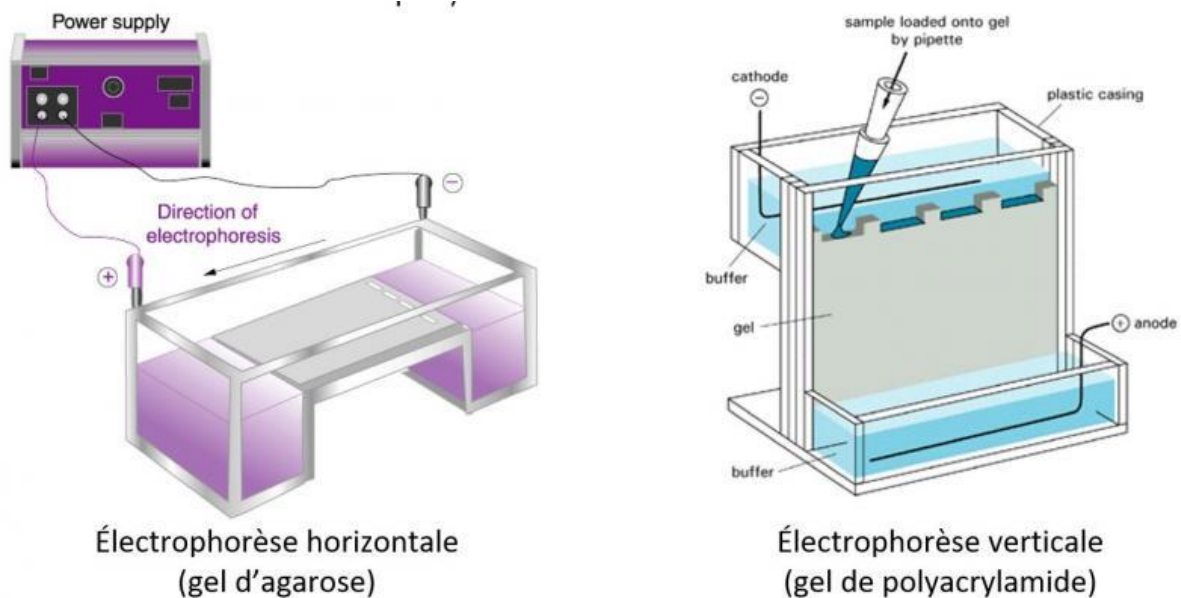
### 1.3.2.5 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les gels, formés entre deux plaques de verre, sont obtenus par polymérisation d'un mélange d'acrylamide ( $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) et de bisacrylamide ( $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH} = \text{CH}_2$ ), ce qui aboutit à la formation d'un réseau réticulé. Les concentrations en acrylamide et le ratio acrylamide/bisacrylamide déterminent la taille des pores et donc les capacités résolutes du

# CHAPITRE I : L'ELECTROPHORESE DES PROTEINES SERIQUES

gel. Ces techniques peuvent être utilisées pour séparer des protéines ou bien des acides nucléiques (de courte séquence en général) en condition native ou dénaturante.

L'électrophorèse est réalisée à l'aide d'un montage vertical, les échantillons étant déposés dans des puits localisés au sommet du gel [8].



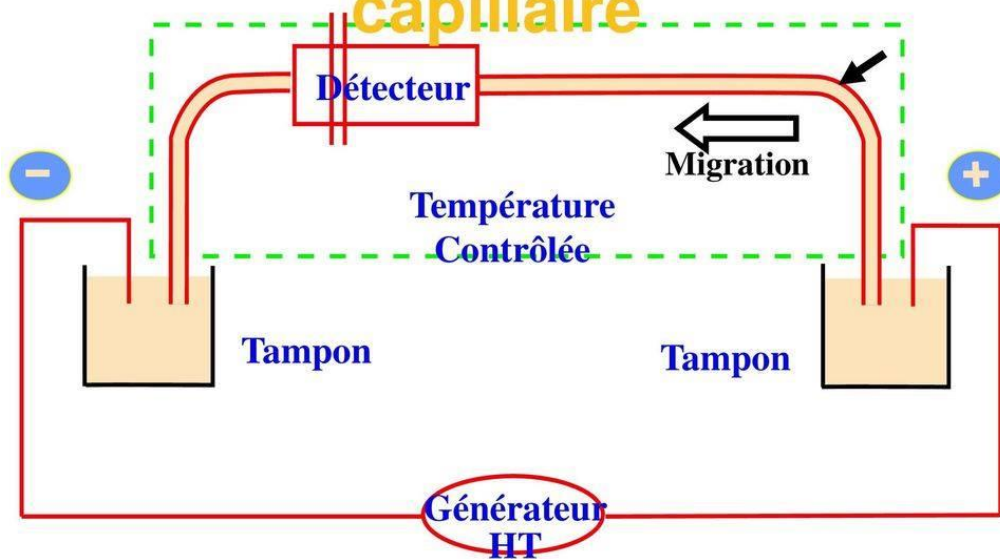
**Figure 4** : Représentation d'une électrophorèse horizontale sur gel d'agarose et une électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide.

### 1.3.3 L'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une technique de séparation électrocinétique effectuée dans un tube de faible diamètre remplie d'un tampon composé d'électrolytes. Le capillaire utilisé est ouvert à ses deux extrémités. Ces derniers plongent dans deux réservoirs d'électrolytes.

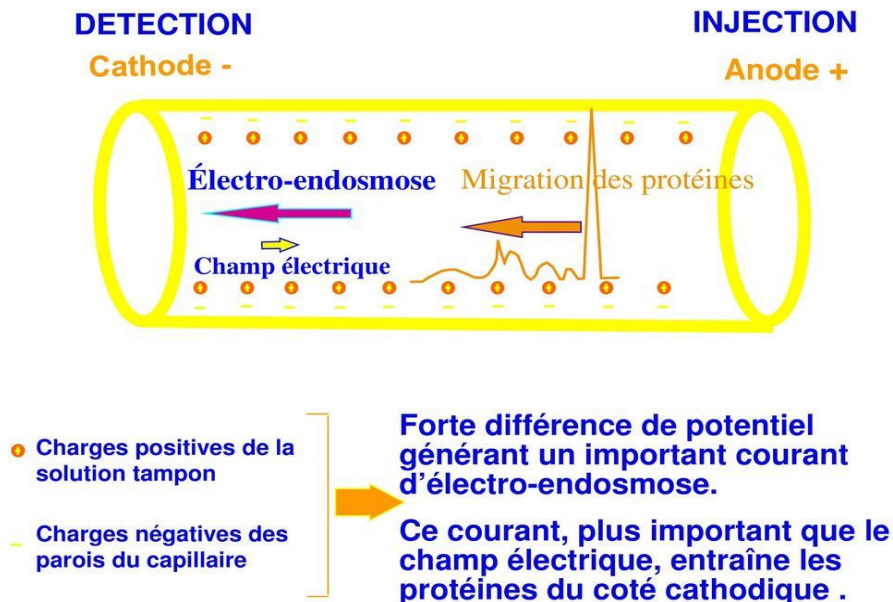
A l'aide d'un champ électrique de haute tension, les molécules chargées seront séparées selon leur mobilité qui dépend du rapport taille/charge de ces molécules, Un détecteur est placé avant la sortie du capillaire [11].

## Schéma de l'électrophorèse capillaire



**Figure 5** : Principe d'un système d'électrophorèse capillaire [9].

Le principe de séparation est basé sur deux phénomènes majeurs : l'électro-migration et l'électro-endosmose [12].



**Figure 6** : Représentation du principe de l'électro-endosmose.

## **1.4 Indication de l'électrophorèse des protéines sériques**

L'électrophorèse des protéines sériques est un outil de qualité pour le praticien et un examen au coût modéré. Si elle n'est pas à mettre en œuvre en première intention, elle est toutefois extrêmement utile dans la démarche diagnostique et le suivi de nombreuses affections [11].

L'électrophorèse des protéines sériques est indiquée [13] :

- ✓ Lors des infections à répétitions des voies aériennes supérieures et pulmonaires.
- ✓ Lorsqu'on constate une modification de la protidémie (augmentation ou diminution), afin d'apprécier les fractions affectées.
- ✓ Anomalie de l'hémogramme sans causes évidentes.
- ✓ Lors de la réalisation d'un bilan gériatrique complet.
- ✓ Lors de troubles infectieux d'évolution inhabituelle.
- ✓ une insuffisance rénale et hépatique
- ✓ Syndrome inflammatoire et néphrotique
- ✓ Neuropathie périphérique inexplicée (non attribuée au diabète sucré de longue date, exposition à la toxine, chimiothérapie, etc.)
- ✓ Détection des gammopathies monoclonales.

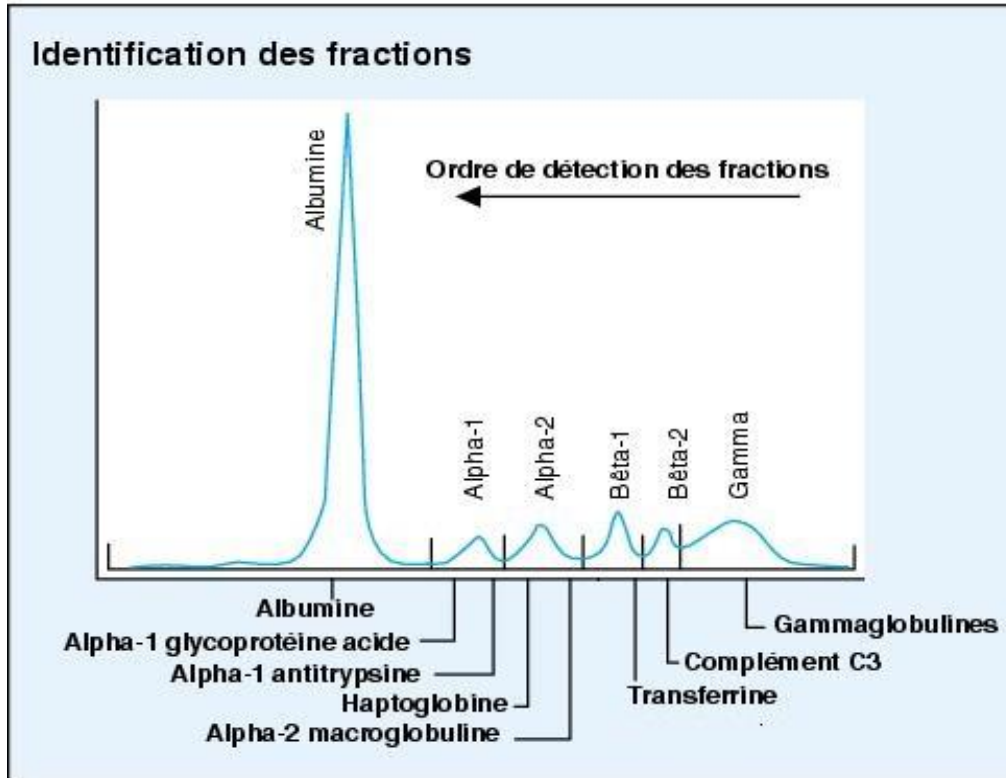
## **2. LES PROTEINES SERIQUES**

### **2.1 Définition**

Les protéines sériques sont des protéines contenues dans le sérum ou plasma sanguin, la partie liquide du sang. Elles exercent différentes fonctions de l'organisme ; de transport, de défense, de régulation des échanges d'eau entre le milieu intra et extra cellulaire. Parmi les protéines sériques, on distingue essentiellement l'albumine et les globulines de différents types.

L'électrophorèse des protéines sériques (EPP) est un examen biologique qui consiste à séparer ces protéines en fractions afin de les identifier et de les quantifier. Cette analyse permet alors de diagnostiquer plusieurs pathologies liées à une altération du système immunitaire, comme des syndromes inflammatoires, des proliférations ou des déficits anormaux de certaines d'entre-elles, l'altération de la fonction hépatique ou des fuites protéiques [14].

Les résultats de cet examen sont présentés sous forme d'un graphe (Protéinogramme) (voir figure 3) :



**Figure 7:** Profil électrophorétique des différentes fractions des protéines sériques.

**Tableau 1 :** Les différentes fractions des protéines sériques. (D.Carrer)

Fractions de migration	Principales protéines de la fraction
Albumine	Albumine
$\alpha_1$ -globulines	$\alpha$ -1 glycoprotéines acide $\alpha$ -1 antitrypsine
$\alpha_2$ -globulines	Haptoglobine Antithrombine Alpha lipoprotéine $\alpha$ -2 macroglobuline Céruloplasmine
$\beta_1$ -globulines	Hémopéxine Transferrine Beta lipoprotéine

$\beta_2$ -globulines	Complément C3, IgA
$\gamma$ -globulines	IgG, IgA, IgM, IgD, IgE

### 2.2 Les principales protéines sériques

#### 2.2.1 Groupe des albumines

##### 2.2.1.1 Transthyréline (ou thyroxine binding pré-albumine, TBPA) et Rétinol-bindingprotein (RBP)

La pré-albumine doit sa dénomination à sa vitesse de migration électrophorétique car elle est la plus anodique des protéines [15].

- **Propriétés Physico-chimiques**

La pré-albumine et le RBP sont des holoprotéines, de petite taille. Elles sont de structure tétraédrique et composées de quatre sous unités identiques. Le tétramère définit un canal central doté de deux sites potentiels de fixation pour la T4 et le T3. Dans les conditions physiologiques, un des quatre monomères porte latéralement le RBP [16, 17].

- **Propriétés Métaboliques**

Les deux protéines sont synthétisées par les hépatocytes. Par ailleurs, il faut préciser que le zinc est indispensable à la synthèse de la RBP. La demi-vie de la pré-albumine est courte (2 jours) et reflète les fluctuations nutritionnelles rapides. Par contre, celle de la RBP liée à la pré-albumine est de 12 heures [18,19].

- **Propriétés Biologiques**

Dans son rôle de transporteur, la pré-albumine fixe et transporte les hormones thyroïdiennes (T3 et T4) raison pour laquelle on l'appelle également thyroxinbinding pré-albumin. Quant à la RBP, elle est le vecteur sanguin unique de la vitamine A dans sa forme alcoolique. On note que

## **CHAPITRE I : L'ELECTROPHORESE DES PROTEINES SERIQUES**

---

la RBP se combine à la pré- albumine dans un rapport stœchiométrique (1:1) et le complexe assure la fixation et le transport plasmatique de la vitamine A.

- **Valeurs usuelles**

Les valeurs normales sont estimées pour la pré-albumine entre 0,2 à 0,42 g/L. pour la RBP, elles sont comprises entre 0,03 et 0,06 g/L, ces valeurs varient avec l'âge et le sexe [15].

### **2.2.1.2 Albumine**

L'albumine est la protéine la plus abondante dans le sérum humain, synthétisée par le foie. Elle représente environ 60% des protéines totales [20]. C'est une holoprotéine d'une seule chaîne peptidique de 564 acides aminés. Elle a un pH de 4,7 et une demi -vie de 15 à 20 jours [20, 21,22].

- **Propriétés Biologiques**

L'albumine est responsable de 80% de la pression oncotique. Cette dernière permet le contrôle des échanges hydriques entre le secteur vasculaire et le secteur interstitiel.

Dans les hypo albuminémies, il y a une baisse de la pression oncotique. Au pôle veineux des capillaires, la pression va être insuffisante par rapport à la pression hydrostatique pour assurer le rappel d'eau dans le secteur vasculaire. Il se produit donc une stase de fluide dans le milieu interstitiel avec des œdèmes dans les tissus périphériques.

L'albumine assure le transport plasmatique de ligands variés. La liaison au ligand est solide mais non covalente donc réversible [21,22].

- **Valeurs normales**

L'albumine représente 55 à 60% des protéines sériques soit 40-45 g/L. Chez l'homme, l'albuminémie est 5% supérieure à celle chez la femme [20].

Le rapport Albumine/Globuline est de 1/3 chez un adulte sain. Vu sa longue demi-vie, l'albumine présente un faible intérêt pour dépister les altérations nutritionnelles récentes mais une bonne sensibilité pour démasquer une dénutrition ancienne [10, 23,24].

- **Variations physiologiques**

L'albuminémie présente des variations physiologiques [25] :

## **CHAPITRE I : L'ELECTROPHORESE DES PROTEINES SERIQUES**

---

- chez l'homme : la concentration varie entre 40 à 50 g/l.

-chez la femme enceinte on observe une augmentation légère au début, puis une diminution d'environ 25% par hémodilution

.- Une diminution est également observée chez les femmes sous oestroprogestatifs.

- Chez les patients sous perfusion de colloïdes synthétiques (utilisés dans les services de réanimation en remplacement à l'albumine) on note une hypoalbuminémie.

- **Variations pathologiques :**

- **Bis albuminémie**

Elle est caractérisée par un dédoublement du pic dont l'étiologie est soit une mutation héréditaire (expression permanente d'un variant de l'albumine sans conséquence pathologique observée à ce jour), soit une anomalie acquise transitoire (présence d'une fistule pancréatique avec hydrolyse de l'albumine sous l'action des enzymes pancréatiques au sein de la fistule) [26].

- **Analbuminémie**

C'est une atteinte exceptionnelle caractérisée à l'électrophorèse par la présence d'un très petit pic d'albumine, contrastant avec une augmentation compensatrice de toutes les globulines pour assurer la pression oncotique. Les signes cliniques de l'atteinte se limitent en général à des œdèmes diffus [26].

- **Hypo albuminémie**

La synthèse de l'albumine étant strictement hépatique, sa diminution dépend de trois mécanismes :

- Une synthèse diminuée par insuffisance hépatocellulaire, malnutrition ou inflammation ;
- Une perte accrue par fuite digestive, urinaire (syndrome néphrotique) ou cutanée (brûlures) ;
- Un hyper catabolisme dans la thyrotoxicose, le syndrome de Cushing, ou des syndromes tumoraux.

- **Hyper albuminémie**

Sans conséquence pathologique chez le sujet sain, elle traduit une hémococoncentration, ou bien une perfusion d'albumine.

## **2.2.2 Groupe des globulines**

### **2.2.2.1 Groupe des Alpha globulines**

#### **A. Les alpha 1-globulines**

Il s'agit d'un groupe hétérogène qui contient principalement :

##### **a) $\alpha$ 1-antitrypsine**

C'est une glycoprotéine globulaire, la plus abondante des  $\alpha$ 1-globulines dans le sérum, synthétisée au niveau hépatique et sa demi-vie biologique est de 5 jours. Elle est douée d'action anti-protéasique et joue un rôle important dans les réactions inflammatoires [26].

- **Valeurs Normales et variations physiologiques :**

Les valeurs usuelles se situent entre 0.8 et 2 g/L. On note cependant une augmentation en cas de grossesse et lors de la prise d'oestroprogestatifs [29].

##### **b) Orosomucoïde ou $\alpha$ 1-glycoprotéine acide**

C'est une glycoprotéine, de faible masse moléculaire (44 kDa). Elle a un caractère très acide :  $pH_i=2,7$ . Sa synthèse et son catabolisme sont principalement hépatique [30].

- **Propriétés biologiques**

C'est une protéine de la phase aiguë de la réaction inflammatoire (PRI+) et elle aide au transport plasmatique de la progestérone et de certains médicaments cationiques. Elle exerce un rôle immunomodulateur en inhibant la prolifération lymphocytaire en réponse à plusieurs mitogènes. Elle favorise la croissance des fibroblastes et se fixe sur le collagène [30].

- **Valeurs usuelles**

Les valeurs normales sont comprises entre 0,5 et 1,3g/L [29].

#### **🦋 Variations pathologiques des alpha 1 globulines**

##### **➤ Hypo- $\alpha$ -1-globulinémie**

L'hypo- $\alpha$ -1-globulinémie se produit en cas :

a) D'insuffisance hépatique ; de dénutrition, de fuite urinaire ou digestive ainsi que dans le cas de surcharge martiale (trop de fer dans l'organisme).

b) De mutations génétiques dans le gène codant pour  $\alpha$ -1- antitrypsine qui produisent des concentrations faibles ou indétectables de cette protéine et prédisposent à l'apparition de l'emphysème ou cirrhose du foie [31].

### ➤ **Hyper- $\alpha$ -1-globulinémie**

Il se produit dans :

a) La réaction inflammatoire de phase aiguë due à une augmentation des concentrations d' $\alpha$ -1-antitrypsine et d' $\alpha$ -1-glycoprotéine acide.

b) Traitement avec des œstrogènes pendant la grossesse et l'hépatite.

c) L'excès de glucocorticoïdes (endogènes ou exogènes) pour une augmentation de la synthèse de l' $\alpha$ -1-glycoprotéine acide.

## **B. Les alpha 2-globulines**

On y trouve l'haptoglobine, l'alpha2 macroglobuline et la céruloplasmine. Ces protéines constituent 8,5 à 15 % soit 6 à 10 g/L des protéines sériques [29].

### **a) L' $\alpha$ 2-Macroglobine**

C'est une glycoprotéine assez abondante dans le sérum, pouvant former des complexes avec diverses protéases. Elle augmente peu dans le syndrome inflammatoire mais beaucoup au cours du syndrome néphrotique [22].

#### **• Propriétés biologiques**

L'alpha 2 macroglobuline peut se lier avec diverses molécules telles que les ions, les hormones (insuline). Elle possède un rôle antiprotéasique avec des endopeptidases bactériennes et leucocytaires et avec d'autres protéases circulantes comme la plasmine, la pepsine, la trypsine, la chymotrypsine, la cathepsine. C'est aussi un inhibiteur efficace de la fibrinolyse [32].

### ➤ **Valeurs normales et variations physiologiques**

Chez l'adulte, les valeurs usuelles sont comprises entre 1,3 et 3 g/L avec une variation chez la femme où les valeurs sont supérieures de 10% par rapport à l'homme. Chez les personnes âgées (après 70 ans), on note une légère augmentation.

Chez l'enfant sont élevées de 50% et reste supérieur à celle de l'adulte jusqu'à 16 ans [32].

### **b) Haptoglobine**

C'est une glycoprotéine du groupe des  $\alpha_2$ -globulines, synthétisée au niveau hépatique et sa demi-vie biologique est de 3 à 5 jours. Son catabolisme se déroule dans les hépatocytes et dans les macrophages [33].

- **Propriétés biologiques**

C'est un marqueur de la réaction inflammatoire et d'hémolyse intra vasculaire on observe un effondrement du taux sérique de l'haptoglobine (Hp) en cas d'hémolyse intra vasculaire. Ceci est dû à la liaison irréversible de l'Hp à l'hémoglobine (Hb) libérée dans une proportion stœchiométrique. La demi-vie de ce complexe est de 20 minutes [34].

- **Valeurs normales et variations physiologiques**

Chez l'adulte, les valeurs normales sont comprises entre 0,3 et 2,0 g/l.

Les concentrations sont nulles chez le nouveau-né par immaturité hépatique, puis augmentent régulièrement jusqu'à l'âge adulte [33].

### **c) Céruloplasmine, (ou Céruléoplasmine)**

C'est une glycoprotéine du groupe des  $\alpha_2$ -globulines qui contient six atomes de cuivre. Elle fait partie de la famille des oxydases bleues à cuivre, et catalyse l'oxydation à 4 électrons de nombreux substrats (amines, phénols,  $Fe^{2+}$ ...) couplée à la réduction du dioxygène en eau. Une fois synthétisée et sécrétée par le foie, elle migre vers les tissus où le cuivre est utilisé et elle y est catabolisée avec libération du cuivre. Sa demi-vie biologique est de 4 à 5 jours [35].

- **Propriétés biologiques**

- Protéine de la phase aiguë de l'inflammation (PRI+).
- elle joue un rôle antioxydant, et serait impliquée dans de nombreux processus métaboliques comme celui du cuivre, des amines biogéniques, et de l'oxyde nitrique. Elle permet aussi : la fixation du cuivre plasmatique, l'oxydation du fer et son incorporation dans la transferrine.

- **Valeurs normales et variations physiologiques**

Les valeurs normales chez l'adulte sont comprises entre 0,2 - 0,6 g/L [29].

### 🌿 Variations pathologiques des $\alpha$ -2-globulines

#### ➤ **Hypo- $\alpha$ -2-globulinémie**

Il se produit dans [36] :

- a) Les processus qui réduisent la synthèse hépatique des protéines ou processus qui augmentent le catabolisme ;
- b) Processus d'hémolyse in vivo en raison d'une diminution de la concentration de l'haptoglobine due à l'élimination rapide des complexes haptoglobine-hémoglobine formés ;
- c) Pancréatite aiguë et carcinome de la prostate par élimination des complexes formés entre  $\alpha$ -2-macroglobuline et les protéases pancréatiques ou l'antigène spécifique de la prostate respectivement.

#### ➤ **Hyper- $\alpha$ -2-globulinémie**

Il se produit dans [36] :

- a) La réaction inflammatoire de phase aiguë due à une augmentation de concentration d'haptoglobine et de céruloplasmine ;
- b) Syndrome néphrotique dû à une augmentation relative de la concentration d' $\alpha$ -2-macroglobuline.
- c) L'excès de glucocorticoïdes (endogène ou exogène) par augmentation de la concentration d'haptoglobine.
- d) Dans les maladies caractérisées par une vascularite comme l'arthrite rhumatoïde ou dans les maladies associées à la présence de complexes immuns qui migrent dans cette fraction.

### **2.2.2.2 Groupe des $\beta$ -globulines**

Ce groupe constitue 8,5 à 15 % soit 6 à 10 g/L des protéines sériques [29].

#### **A. Transferrine (Tf) ou Sidérophiline**

La transferrine est une glycoprotéine soluble qui assure le transport du fer dans le sang.

Elle est principalement synthétisée par le foie ainsi que dans quelques autres tissus (cellules de sertoli, certaines cellules du cerveau, glandes mammaires...) en faible quantité .Sa demi-vie biologique est de 7 jours [35].

- **Propriétés biologiques**

Transport du  $Fe^{3+}$  : elle régule l'absorption du fer suivant sa saturation, mais possède des propriétés inhibitrices de la multiplication virale. En plus du fer, la transferrine peut servir de transporteur pour un certain nombre de métaux comme l'Aluminium, le Manganèse, le Cuivre, et le Cadmium [37]. C'est un marqueur très sensible de la dénutrition mais son utilisation isolée pour un bilan nutritionnel est insuffisante [38 ; 39].

- **Valeurs normales et variations physiologiques**

Les valeurs normales sont généralement comprises entre 2 et 3,8 g/L [29].

On observe des variations chez la femme enceinte, en fin de grossesse où la concentration s'élève autour de 4,4g/L, en raison de l'anémie ferriprive, habituelle à cette période.

#### **B. Protéine C- Réactive (CRP)**

- **Propriétés biologiques**

La CRP est reconnue pour jouer un rôle dans l'élimination des bactéries. Elle a par ailleurs un rôle d'activation du complément, de facilitation de la phagocytose des bactéries et de modulation de la multiplication des lymphocytes T [40].

- **Valeurs normales et variations physiologiques**

Les valeurs usuelles sont inférieures à 3 mg/l chez l'homme et la femme [29].

### **🌿 Variations pathologiques des $\beta$ globulines**

Cette fraction apparaît divisée en deux sous-fractions connues comme  $\beta$ -1 et  $\beta$ -2-globulines dans les méthodes de séparation basées sur l'électrophorèse capillaire et certaines méthodes utilisant le gel d'agarose.

#### **➤ Hypo- $\beta$ -1-globulinémie**

Elle se produit dans :

- a) Les processus qui réduisent la synthèse hépatique des protéines ainsi ceux qui présente des pertes protéiques au niveau rénal, digestif ; cutané ou des processus qui augmentent le catabolisme.
- b) Surcharge de fer due à l'inhibition de la synthèse de la transferrine.
- c) transfusions répétées dues à la perte de transferrine.

#### **➤ Hypo- $\beta$ -2-globulinémie**

Elle se produit dans :

- a) Les processus qui réduisent la synthèse hépatique des protéines, les processus qui ont des pertes de protéines au niveau rénal, digestif ou cutané ou des processus qui augmentent le catabolisme.
- b) Déficits en protéines du complément (présence d'anticorps anti-C3 ou déficit génétique de C3).
- c) Perte ou dégradation in vitro des protéines du complément pour une conservation inadéquate ou prolongée.

#### **➤ Hyper- $\beta$ -1-globulinémie**

- a) Carence en fer due à une synthèse accrue de la transferrine.
- b) Traitement avec des œstrogènes et des progestatifs et pendant la grossesse par induction de la synthèse de la transferrine.
- c) Processus associés à une augmentation des  $\beta$ -lipoprotéines (dans les méthodes de séparation en utilisant un gel d'agarose).

### ➤ **Hyper- $\beta$ -2-globulinémie**

En cas [36] :

- a) La réaction inflammatoire de phase aiguë due à une augmentation de la concentration des protéines du complément.
- b) Processus d'obstruction biliaire intra ou extra hépatique par augmentation de la concentration de la protéine du complément C3.

↳ Un dédoublement ou un épaulement dans la fraction  $\beta$  2-globulines peut traduire :

- la présence d'une protéine monoclonale (IgA, IgG, chaîne légère libre, voire une IgM) ;
- la présence de fibrinogène.

### **2.2.3 Groupe des gammaglobulines**

La réponse humorale se fait à travers un groupe de protéines ayant des propriétés semblables mais des fonctions différentes. Il s'agit des Immunoglobulines (Ig).

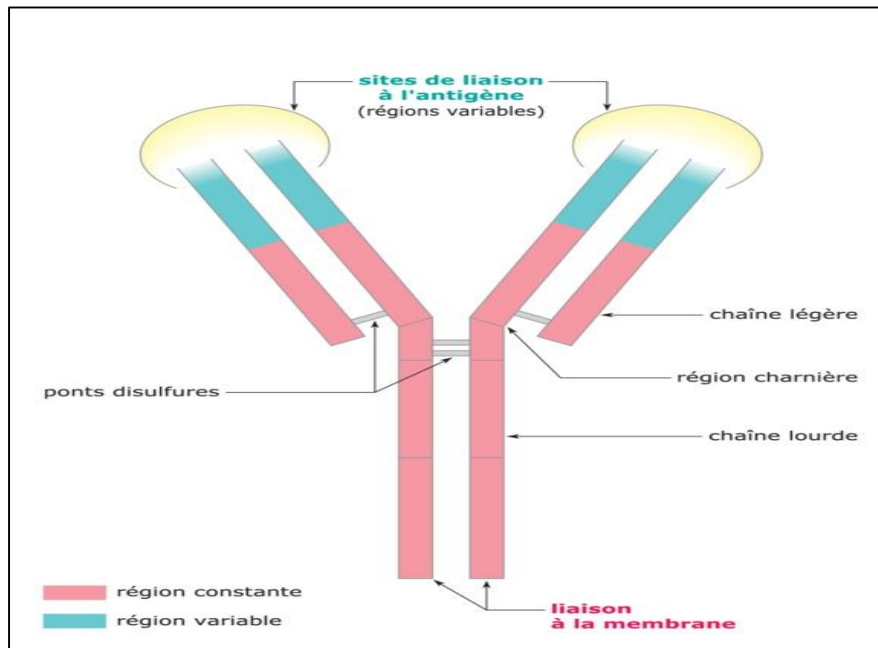
Il s'agit d'une famille complexe de protéines glycosylées. Elles sont présentes dans les liquides biologiques et les sécrétions et représentent environ 20% des protéines plasmatiques. Elles représentent 11,1 - 18,8 % soit 8,0 - 13,5 g/L.

Les gammaglobulines sont douées d'activités anticorps : ce sont les agents de l'immunité humorale [41].

#### • **Propriétés physico-chimiques**

Les Ig sont constituées de quatre chaînes polypeptidiques : Deux chaînes identiques de masse moléculaire élevée, dites « lourdes » (H pour heavy) et deux chaînes identiques de masse moléculaire moyenne, dites « légers » (L pour light). Les chaînes sont liées entre elles par des ponts disulfures [22]. Chaque paire de chaînes est composée de deux régions : une variable et une constante. Chaque immunoglobuline appartient à un type (kappa et lambda) déterminé par la nature de la chaîne légère et à une classe déterminée par la nature de la chaîne lourde (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE).

- **Structure d'une immunoglobuline**



**Figure 8 :** Représentation schématique d'une immunoglobuline.

- **Propriétés métaboliques**

Les Ig sont synthétisées par des cellules spécifiques qui sont dans la moelle osseuse : les plasmocytes, dérivant des lymphocytes B activés. Cette synthèse est secondaire au contact de l'organisme avec une substance étrangère : des antigènes. Ces anticorps sont produits et sécrétés dans la circulation générale.

- **Propriétés biologiques**

Une immunoglobuline (Ig) est spécifique de l'antigène (Ag) qui a déclenché sa synthèse. La spécificité est le plus souvent absolue.

L'exploration des Ig peut révéler différentes anomalies :

- **Variations pathologiques des gammaglobulines**

- **Hypo- $\gamma$ -globulinémie** : elle se produit dans :

- a) Les déficits dans la synthèse des immunoglobulines (nouveau-nés, immunodéficiences) primaire ou secondaire à des médicaments tels que corticostéroïdes, immunosuppresseurs ou traitement par chimiothérapie, radiothérapie) ou gammopathies monoclonales

b) Les pertes protéiques au niveau rénal (glomérulopathies).

➤ **Hyper- $\gamma$ -globulinémie**

a) Polyclonale acquise produit dans :

- Les processus infectieux viraux ou bactériens.
- Maladie du foie.
- Processus auto-immunes : cirrhose biliaire primitive, maladie du collagène.

b) Monoclonale lors des gammopathies monoclonales [42].

### **3. PROFILS ELECTROPHORETIQUES**

L'interprétation du profil électrophorétique nécessite une connaissance du tracé électrophorétique normal et de la composition protéique de chacune des fractions qui le composent ainsi que les processus physiopathologiques qui produisent des modifications qualitatives ou quantitatives de celles-ci. Ensuite, on procède à la description détaillée de l'aspect du profil électrophorétique (Figures 3).

La situation des protéines dans le profil électrophorétique a été décrite en prenant comme référence celle qui se produit après la séparation électrophorétique capillaire.

#### **3.1 Protidémie**

Le taux moyen des protéines sériques est de 60 à 80 g/L chez l'adulte sain.

Pendant la grossesse, la protidémie diminue par augmentation du volume sanguin circulant. On note chez le prématuré un taux de 40 g/L. A la naissance, les protéines totales ne dépassent pas 40 à 60 g/. Par ailleurs, on observe des variations du taux avec l'âge, et l'activité physique [43].

#### **3.2 Variations de la protidémie**

##### **3.2.1 Les hyper protidémies**

Par augmentation de la masse protéique totale circulante : Dysglobulinémies monoclonales ou polyclonales.

Dans le cas d'une hémococentration : Insuffisance d'apport, Perte liquidienne (coup de chaleur, diarrhée, vomissement...) [44].

## 3.2.2 Les hypo protidémies

Par diminution de la masse protéique totale circulante :

- Défaut d'apport (malnutrition).
- Insuffisance de synthèse hépatique.
- Déperdition protéique (cutanée rénale ou intestinale).
- hémodilution (Surcharge hydrique).

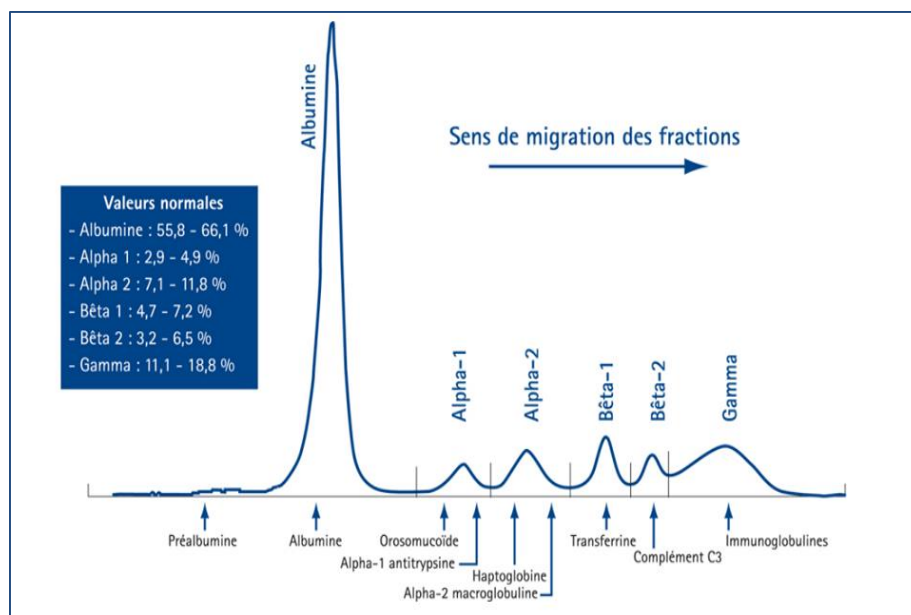
En règle générale, toute protidémie inférieure à 60 g/l ou supérieure à 80 g/l doit être complétée par une électrophorèse des protéines sériques [44].

## 3.3 L'interprétation du profil électrophorétique d'un sérum humain normal

L'EPP sépare les protéines sériques en six fractions principales :

- Une fraction de forte intensité, située à proximité de l'anode, est constituée d'une seule protéine : le sérum albumine.
- Les quatre fractions suivantes notées  $\alpha$  1,  $\alpha$  2,  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 sont chacune constituées d'un groupe divers de protéines.
- La fraction  $\gamma$ , fraction large de faible intensité, située à proximité de la cathode n'est pratiquement constituée que d'immunoglobulines.

Les résultats de cet examen sont présentés dans la figure ci-dessous (Protéinogramme) :



**Figure 9:** Protéinogramme sérique normal et identification des fractions protéiques en électrophorèse capillaire sur Capillarys® Sebia.

## **CHAPITRE I : L'ELECTROPHORESE DES PROTEINES SERIQUES**

Des valeurs chiffrées pour chacune des fractions : pourcentage et concentration en g/l calculés à partir de la protidémie. (Voir tableau)

**Tableau 2:** Pourcentage et concentration normales des différentes fractions des protéines sériques.

Fractions	g/l	%
Albumine	40,2 - 47,6	55,8 - 66,1
$\alpha$ 1-globulines	2,1 - 3,5	2,9 - 4,9
$\alpha$ 2-globulines	5,1 - 8,5	7,1 - 11,8
$\beta$ 1 globulines	3,4 - 5,2	4,7 - 7,2
$\beta$ 2 globulines	2,3 - 4,7	3,2 - 6,5
Gammaglobulines	8,0 - 13,5	11,1 - 18,8

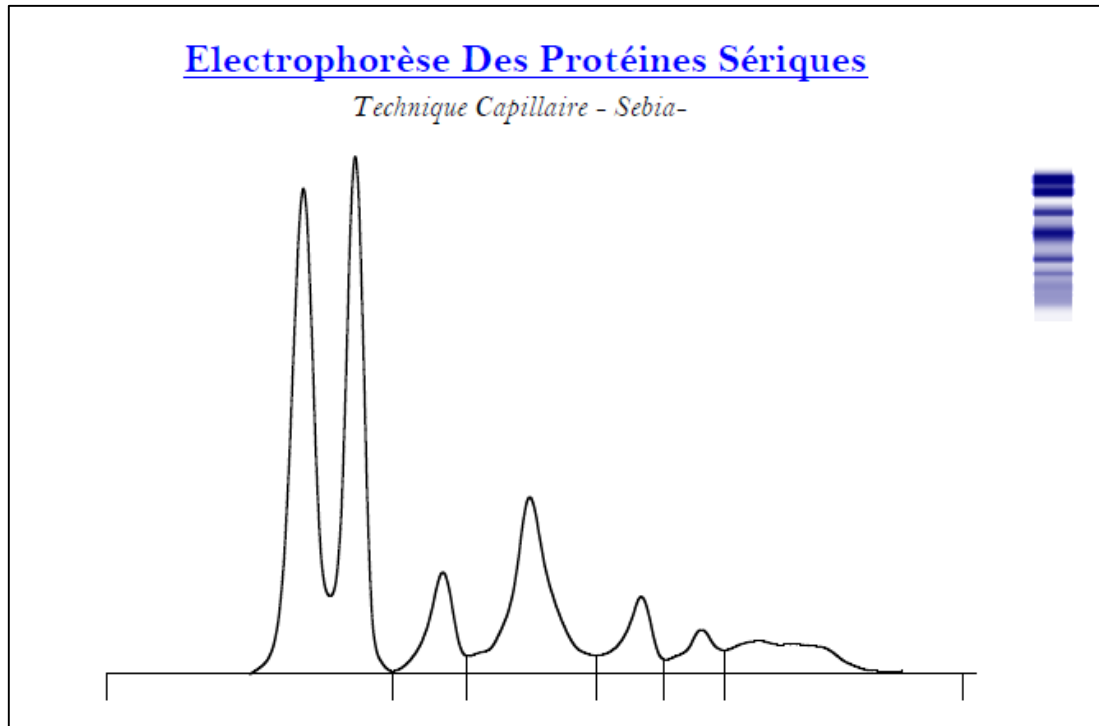
- Si la protidémie est normale, les renseignements sont fournis par des valeurs exprimées en g/l.
- Si la protidémie est anormale, il est nécessaire d'étudier les pourcentages de chaque fraction afin de voir si la variation de la protidémie est due à une modification du taux de toutes les fractions ou seulement de l'une d'entre elles [26].

### **3.4 Interprétation illustrée des principaux profils électrophorétiques pathologiques**

Les différents profils pathologiques rencontrés lors d'interprétation d'un protéinogramme :

#### **3.4.1 Bisalbuminémie**

Dédoublément du pic d'albumine : c'est une mutation héréditaire rare, due à l'expression permanente d'un variant génétique de l'albumine, sans conséquence pathologique actuellement connue. Ce profil est obtenu lors d'une bisalbuminémie congénitale, médicamenteuse ou associée à une pancréatite [45].



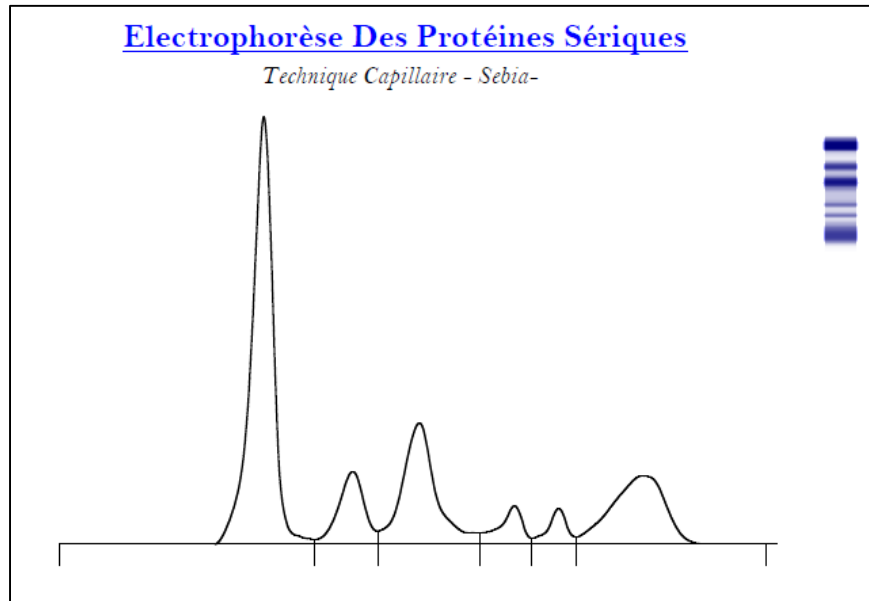
**Figure 10:** Profil électrophorétique d'une bisalbuminémie.

### 3.4.2 Le syndrome inflammatoire

#### ➤ Syndrome inflammatoire aiguë

Caractérisé par une hyper  $\alpha_1$  et hyper  $\alpha_2$  globulines, dû à l'augmentation des protéines de la réaction inflammatoire aiguë [46] causée par :

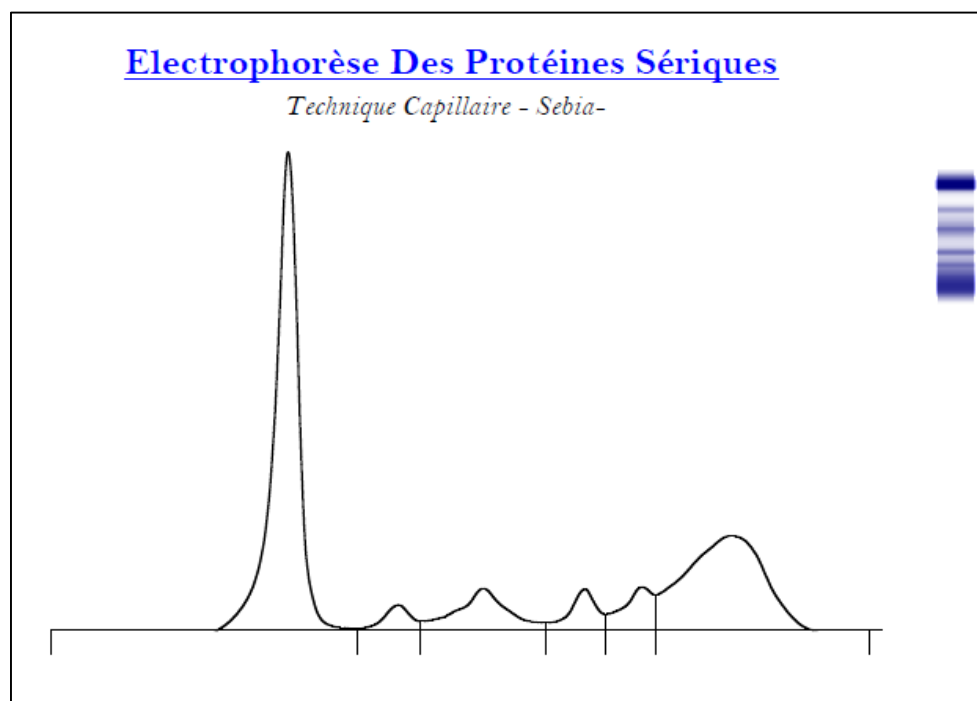
- une inflammation.
- une maladie infectieuse, tumorale, ou traumatique.



**Figure 11:** Profil électrophorétique d'un syndrome inflammatoire aigu.

### ➤ Syndrome inflammatoire chronique

L'inflammation chronique donne lieu à une franche altération du profil électrophorétique, avec une hyper  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  globulines liées à l'inflammation, et une hypergammaglobulinémie liée à l'augmentation du taux d'immunoglobulines témoignant de la chronicité de la maladie inflammatoire [46].



**Figure 12 :** Profil d'un syndrome inflammatoire chronique.

### 3.4.3 Syndrome néphrotique

Le syndrome néphrotique est la traduction clinique d'anomalies rénales très différentes, fonctionnelles ou anatomiques : amylose, diabète, glomérulonéphrite, pathologie auto-immune, altérations idiopathiques notamment.

Au niveau sérique, on observe une hyper alpha 2 importante liée à l'augmentation de l' $\alpha$ 2-macroglobuline et des  $\beta$  lipoprotéines, associée à une hypo protidémie sévère due à la fuite rénale et à une protéinurie massive [47].

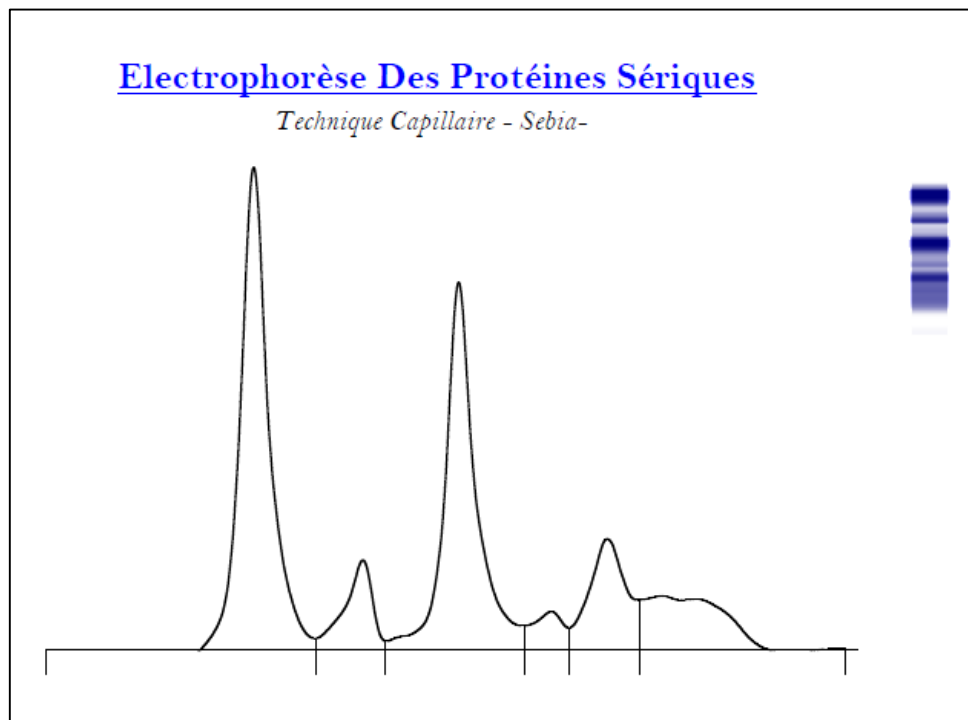


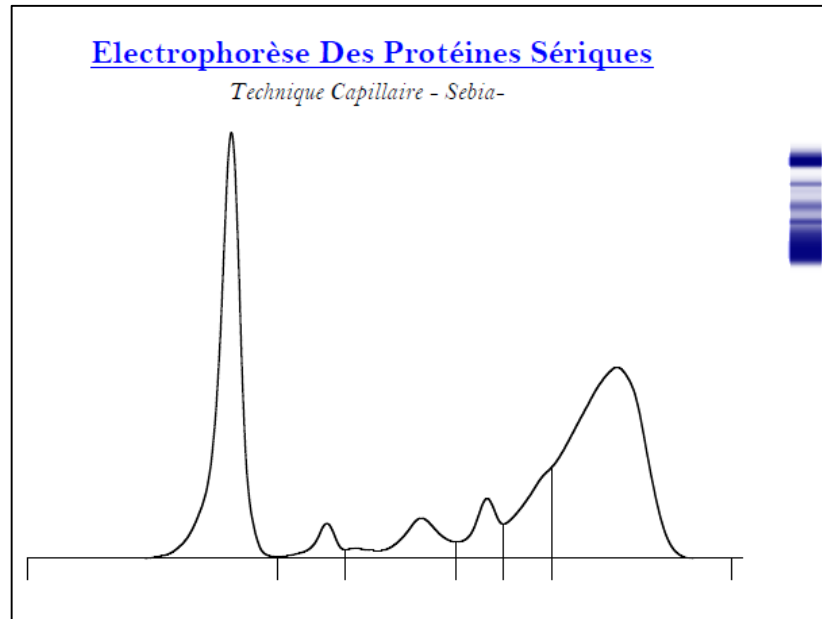
Figure 13: Profil électrophorétique d'un syndrome néphrotique.

### 3.4.4 Bloc bêta gamma

Le profil électrophorétique montre une fusion de la fraction bêta et gamma (bloc bêta gamma) avec un aspect en ' dos de chameau ', liée à l'augmentation de la synthèse des IgA et des IgM, qui dépasse celle des IgG et qui se positionne à l'électrophorèse dans la zone entre bêta et gamma globulines [48].

Ce profil peut expliquer les pathologies suivantes :

- Hépatites chroniques Virales.
- Hépatites médicamenteuses.
- Cirrhose alcoolique ou cirrhose à un stade avancé.

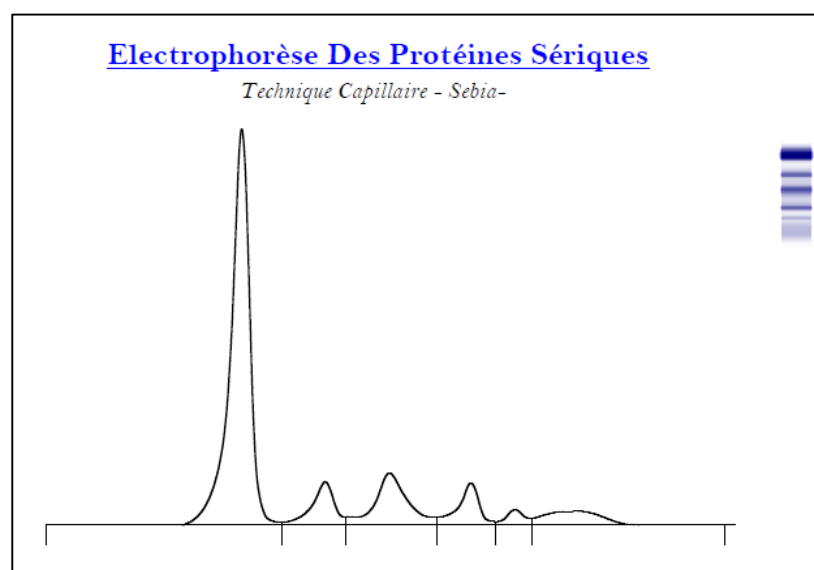


**Figure 14:** Bloc bêta gamma.

## 3.4.5 Les Anomalies des gammaglobulines

### 3.4.5.1 Hypogammaglobulinémie

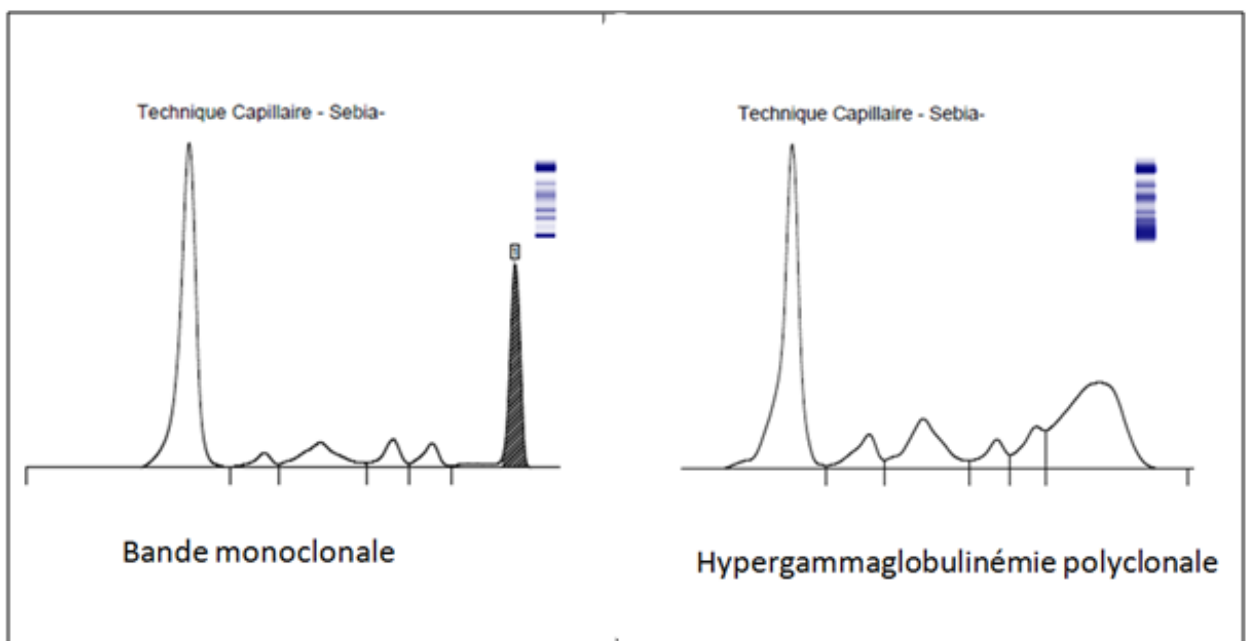
L'hypogammaglobulinémie est liée à une diminution congénitale ou acquise de la production des immunoglobulines, qui est causée soit par un déficit immunitaire soit par un syndrome lymphoprolifératif ou une immunosuppression acquise [42].



**Figure 15:** Profil électrophorétique d'une Hypogammaglobulinémie.

### B. Hypergammaglobulinémie polyclonale

On parle soit de gammopathie polyclonale (plusieurs types Ig) ; Elles sont rencontrées au cours des maladies auto-immunes, des pathologies hépatiques, des infections virales (SIDA), parasitaires et bactériennes ou des gammopathies monoclonales (pic étroit homogène d'une seule Ig) Comme pathologie liée à l'augmentation monoclonale des Ig, on peut citer : (myélome multiple des os ou maladie de Kahler, la maladie de Waldenström, les leucémies lymphoïdes chroniques, les lymphomes et des gammopathies monoclonales de signification indéterminée ou MGUS [49].



**Figure 16** : Profil électrophorétique d'une gammopathie monoclonale et polyclonale.

Lorsque le profil d'une gammopathie monoclonale est détecté, Il est nécessaire de confirmer la présence d'une protéine monoclonale et de déterminer sa nature en identifiant le type de chaînes lourdes et légères qui la composent. L'identification du type du protéine-M par immunotypage est important à la fois pour poser un diagnostic et pour le suivi du patient [49].

**CHAPITRE II**

**LES INTERFERENCES ANALYTIQUES EN**

**ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DES**

**PROTEINES SERIQUES**

## **CHAPITRE II : LES INTERFERENCES ANALYTIQUES EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DES PROTEINES SERIQUES**

---

Les interférences analytiques sont des causes importantes d'erreur de laboratoire [50,51].

Il est important que les laboratoires les reconnaissent, car ils peuvent avoir des conséquences cliniquement significatives.

Ces interférences affectent la plupart des techniques disponibles de manière variable, dont les conséquences peuvent être graves comme une erreur de diagnostic.

### **1. Hémolysse**

#### **1.1 Généralité**

L'hémolysse consiste en la rupture de la membrane plasmique de l'érythrocyte avec pour conséquence la libération de son contenu intracellulaire dont une quantité importante d'hémoglobine. Après centrifugation de l'échantillon de sang total, l'hémolysse se caractérise par une coloration rosée à rouge du plasma ou du sérum. L'intensité de cette coloration varie selon la concentration d'hémoglobine libre.

L'hémolysse peut avoir un effet très délétère sur les soins donnés au patient et à la réputation d'un laboratoire du fait de son impact sur les résultats d'analyses. Il est important de savoir quelles analyses sont le plus affectées par l'hémolysse [52].

On distingue deux types d'hémolysse :

##### **1.1.1. Hémolysse in vivo (physiologique)**

Correspond à une hémolysse pathologique intra vasculaire, aiguë ou chronique. Il s'agit d'une destruction exagérée des hématies normalement produites, dont la durée de vie se trouve ainsi raccourcie. Elle se traduit le plus souvent par une anémie [53].

Plusieurs pathologies peuvent être responsables d'hémolysse in vivo [54]:

##### **a. Hémolysse d'origine corpusculaire**

###### **✚ Malformation globulaire :**

- Drépanocytose (forme en faucille) caractérisée par la présence d'Hbs.
- Thalassémies (microcytes) :  $\alpha$  ou  $\beta$  thalassémie.

###### **✚ Anomalies de membrane :**

- Micro-sphérocytose héréditaire ( $\uparrow$ de la perméabilité au  $\text{Na}^+$  et à l'eau)
- Elliptocytose héréditaire.
- Stomatocytose héréditaire.
- Ananthocytose (perturbation des échanges des lipides de la membrane)

###### **✚ Erythro-enzymopathies congénitales :**

## CHAPITRE II : LES INTERFERENCES ANALYTIQUES EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DES PROTEINES SERIQUES

---

- Déficit en G6PD
- Déficit en pyruvate kinase : défaut de régénération de l'ATP.

### b) Hémolyse extra-corporelle

#### ✚ Causes immunologiques :

Par fixation d'un anticorps sur le GR qui entraîne une activation du complément avec hémolyse intravasculaire soit destruction du GR par les phagocytes des différents organes (foie, rate) : hémolyses auto-immunes, hémolyses immuno-allergiques

#### ✚ Causes toxiques : Plomb, venins des serpents et le cuivre.

#### ✚ Causes infectieuses :

- Bactérienne : septicémie à clostridium perfringens ou à staphylocoque.
- Parasitaire : plasmodium.
- Virale : hépatites virales.

#### ✚ Causes mécaniques : micro-angiopathies, les valves intracardiaques [52].

### 1.1.2. Hémolyse in vitro

Liée au traitement pré-analytique de l'échantillon ; la manipulation inappropriée d'un échantillon, par exemple son agitation excessive ou l'ajout d'eau distillée, peuvent aboutir à une hémolyse. Ainsi l'aspiration trop rapide du sang au cours du prélèvement, la pose prolongée d'un garrot ou l'utilisation d'aiguilles trop fines ; des conditions de transport : pneumatique, température excessive ; et des conditions de centrifugation : vitesse trop importante, re-centrifugation des tubes avec gel séparateur peuvent également contribuer à l'obtention d'un sang hémolysé.

Après l'hémolyse in vitro, tous les constituants des globules rouges, notamment le potassium, les LDH et les ASAT augmentent, ainsi que la concentration de l'hémoglobine dans le plasma ou le sérum [53].

## 1.2 Mécanisme d'interférence de l'hémolyse

L'hémolyse est un facteur d'interférence important qui doit être pris en compte lors des mesures de laboratoire. Son influence ne doit pas être ignorée par le clinicien lors de l'interprétation des résultats.

## **CHAPITRE II : LES INTERFERENCES ANALYTIQUES EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DES PROTEINES SERIQUES**

---

### **1.2.1 Mécanismes d'interférences sur les paramètres biochimiques**

L'hémolyse est une source d'erreur fréquente pour la mesure d'un grand nombre de paramètres biochimiques sanguins, tels que le potassium, la bilirubine totale ou certaines enzymes (LDH et ASAT en particulier).

L'erreur entraînée par l'hémolyse est la somme des protéines libérées par le globule rouge et d'une éventuelle interférence analytique de l'hémoglobine [55 ,56].

Les effets de l'hémolyse peuvent être classés comme suit :

#### **1.2.1.1. Mécanisme de surcharge**

La libération du contenu érythrocytaire induit une surestimation de certains paramètres. Cette augmentation est directement proportionnelle à la concentration intra-érythrocytaire de l'analyte en question et à l'importance de l'hémolyse durant le prélèvement et à chaque étape de la phase pré-analytique [57].

#### **1.2.1.2. Interférence optique**

L'interférence spectrale est causée par la forte concentration d'hémoglobine libérée pendant l'hémolyse et son effet sur les lectures d'absorbance. L'importance de l'interférence ne dépend pas seulement de la longueur d'onde mais aussi du type du blanc échantillon utilisé pour le dosage.

Les principales bandes d'absorption de l'hémoglobine sont situées à 415, 540 et 578 nm.

L'hémolyse est donc susceptible d'influencer la mesure des paramètres dont la détection se fait par spectrophotométrie autour de ces longueurs d'ondes. De plus la structure de l'hémoglobine peut être modifiée en fonction du milieu réactionnel : pH, présence d'agents oxydants ou réducteurs, aboutissant à des formes d'hémoglobine dont le spectre d'absorption est différent influençant ainsi d'autres paramètres [56,58].

#### **1.2.1.3. Mécanisme chimique**

Les interférences chimiques sont liées aux perturbations induites par la substance interférente lors de la réaction chimique ou enzymatique utilisée pour le dosage du paramètre. Il peut donc s'agir de surestimation ou de sous-estimation des résultats.

## **CHAPITRE II : LES INTERFERENCES ANALYTIQUES EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DES PROTEINES SERIQUES**

Dans ce cas, l'interférence est dépendante de la méthode d'analyse par exemple, l'adénylatekinase des érythrocytes interfère avec la plupart des méthodes standards de détermination de la CK [59].

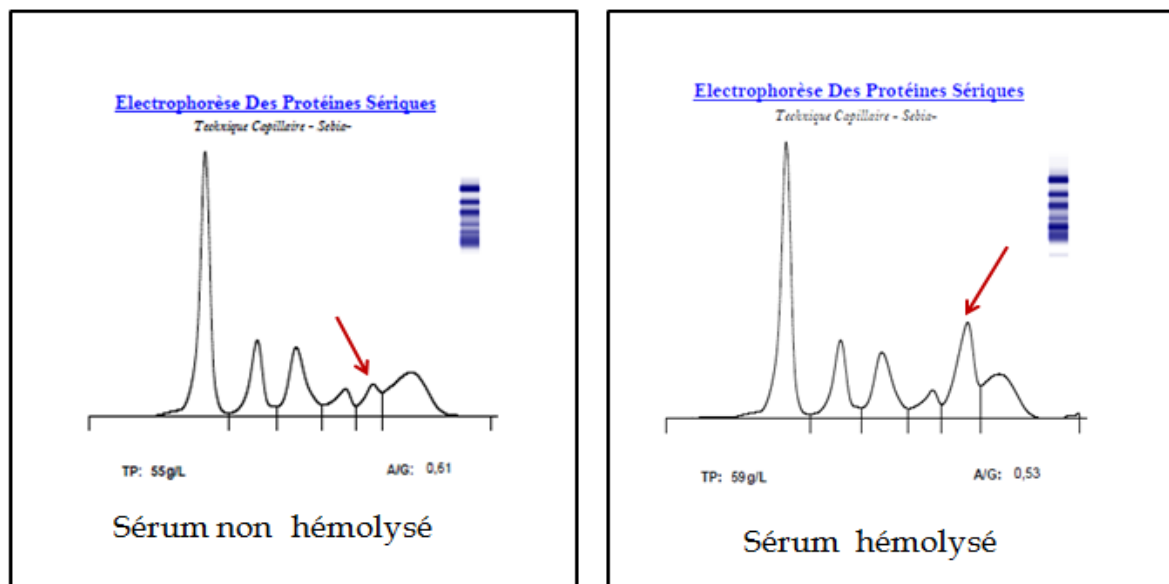
### **1.2.2. Mécanisme d'interférence sur l'électrophorèse capillaire des protéines sériques**

Différentes études ont montré que l'analyse des échantillons hémolysés en électrophorèse capillaire influencent sur le tracé électrophorétique par libération de l'hémoglobine qui migre dans la zone  $\beta$ -globulines

De plus, l'hémoglobine libre dans le plasma forme un complexes avec l' haptoglobine (haptoglobine-hémoglobine) .Ceux-ci vont migrer avec les  $\alpha_2$ -globulines [60].

Lors de l'interprétation d'une électrophorèse des protéines sériques réalisée sur un sérum hémolysé, il faudra :

- sous-estimer les  $\alpha_2$ -globulines,
- sous-estimer les  $\beta$ -globulines.



**Figure 17** : Profils électrophorétiques avant et après hémolyse.

## **CHAPITRE II : LES INTERFERENCES ANALYTIQUES EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DES PROTEINES SERIQUES**

---

### **2. Le fibrinogène**

#### **2.1. Généralité**

Le fibrinogène, également appelé facteur I de la coagulation, est une protéine synthétisée et secrétée par les cellules du parenchyme hépatique, qui possède un rôle majeur dans le processus d'hémostase. La demi-vie plasmatique de cette protéine est de 4 à 6 jours, avec un taux physiologique compris entre 2 et 5 g/L de sang. La concentration minimale indispensable pour pouvoir assurer l'hémostase est de 0,5 g/L [61], mais certaines circonstances cliniques requièrent des concentrations supérieures.

#### **2.2. Variations physiologiques et pathologiques du taux de fibrinogène**

Le taux de fibrinogène augmente physiologiquement au cours de la grossesse [61] et avec l'âge [62].

Plusieurs situations pathologiques vont conduire à une hyperfibrinogénémie telles que les cancers, les syndromes inflammatoires, le syndrome néphrotique, l'utilisation de traitements antirétroviraux ainsi que la consommation de tabac.

L'hypofibrinogénémie peut être retrouvée dans diverses situations, acquises ou constitutionnelles.

Les déficits acquis sont dus à l'insuffisance hépatocellulaire, à la coagulation intra vasculaire disséminée ou la fibrinolyse primitive. De rares cas de dysfibrinogénémies acquises ont été décrites (cancers primitifs du foie, hépatomes, cirrhoses...).

Les déficits constitutionnels sont de 2 types :

- Les déficits quantitatifs : afibrinogénémie (absence de fibrinogène) ou hypofibrinogénémie constitutionnelle. La mesure de l'activité et le dosage pondéral du fibrinogène sont diminués en proportion égale.
- Les déficits qualitatifs : dysfibrinogénémies constitutionnelles, au cours desquelles le dosage pondéral du fibrinogène est normal, mais la mesure de son activité est diminuée [62].

#### **2.3. Rôles**

Le fibrinogène possède de multiples fonctions dans l'organisme, c'est une protéine majeure de l'inflammation, de la cicatrisation, et la fibrine et ses produits de dégradation ont également un rôle dans la formation de la plaque d'athérome en favorisant la migration des monocytes dans la plaque et en s'y liant au LDL cholestérol oxydé.

## **CHAPITRE II : LES INTERFERENCES ANALYTIQUES EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DES PROTEINES SERIQUES**

---

Mais la principale fonction du fibrinogène dans l'organisme est son rôle dans le processus d'hémostase. Il participe au phénomène d'agrégation plaquettaire lors de l'hémostase primaire, et représente également la protéine de la phase finale de la coagulation, en permettant la formation du caillot de fibrine [63].

### **2.4. Mécanisme d'interférence du fibrinogène sur l'électrophorèse capillaire des protéines sériques**

En cas de pré-analyse adéquate, le fibrinogène n'est normalement pas présent dans les échantillons de sérum. Cependant, il peut être présent dans le sérum des patients présentant des troubles de la coagulation, ou chez ceux recevant un traitement anticoagulant. Il peut également être rencontré lorsqu'un échantillon de plasma est fourni par erreur à la place du sérum.

Lors de la réalisation de l'électrophorèse des protéines sériques sur ces échantillons, le fibrinogène migre vers la région  $\beta / \gamma$  et il peut être mal interprété comme une immunoglobuline monoclonale.

L'absence de la protéine monoclonale apparente après électrophorèse par immunofixation, combinée à la localisation caractéristique de la bande dans la région  $\beta / \gamma$ , devrait établir l'identité de cette bande sous forme de fibrinogène et l'IFE avec des anticorps anti-fibrinogène fournit une preuve solide que la bande est bien du fibrinogène [64,65].

## **3. Bilirubine**

### **3.1. Définition**

La bilirubine est un pigment jaune (PM=584.6 Da), formée par la juxtaposition de quatre noyaux pyrroles. Selon son état dans l'organisme avant ou après son passage dans le foie [66,67], on distingue deux types de bilirubine :

- la bilirubine conjuguée est hydrosoluble, elle est dosée directement grâce à la diazo-réaction, d'où son nom de bilirubine directe
- la bilirubine libre est liposoluble, la diazo-réaction se produit de manière indirecte après adjonction d'alcool méthylique, d'où le nom de la bilirubine indirecte [68].

La bilirubinémie est normalement inférieure à 12 mg/l et sur les 12mg/l d'une bilirubinémie normale ; nous avons :

## **CHAPITRE II : LES INTERFERENCES ANALYTIQUES EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DES PROTEINES SERIQUES**

---

-la plus grande partie ou la totalité représentée par la bilirubine indirecte.

-le reste, 0 à 1mg/l soit au maximum 10% représentée par la bilirubine directe.

### **3.2. Le métabolisme normal de la bilirubine**

#### **⇒ Etape pré-hépatique : synthèse de la bilirubine**

La bilirubine est un pigment provenant en majeure partie de la destruction dans le système réticulo-endothélial des hématies dont la durée de vie est en moyenne de 120 jours. La destruction des hématies conduit à la libération : - d'hémoglobine, qui est ensuite déstructurée en chaîne  $\alpha$  et  $\beta$ , - de fer, - de globine, - et de la fraction héminique, qui, une fois dégradée par action de l'hème oxygénase, conduit à la libération de la bilirubine libre (BL) ou non conjuguée (BNC) [69].

#### **⇒ Etape hépatique : conjugaison**

La bilirubine non conjuguée (BNC) est très peu soluble dans l'eau (liposoluble). La conjugaison hépatique est donc une étape obligatoire pour que la bilirubine puisse être excrétée dans la bile. La conjugaison se fait principalement avec l'acide glucuronique grâce à une enzyme du réticulum endoplasmique, la bilirubine-glucuronyl transférase ou BGT. Cette enzyme ne prend en charge que la bilirubine liée à l'albumine. Lorsque les fonctions hépatiques sont normales, la bilirubine est totalement transformée dans le foie en bilirubine conjuguée. La bilirubine conjuguée hydrosoluble sera ensuite excrétée dans la bile [69].

#### **⇒ Etape post-hépatique : élimination**

Déversée dans le duodénum, la bilirubine subira une succession de modifications structurales conduisant à la formation de bilinogène, dont la majeure partie sera excrétée sous forme de stercobiline dans les selles et urobiline dans les urines. En cas de transit ralenti (ce qui est fréquemment dans le cas dans le premier jour de vie et en cas d'alimentation insuffisante), une réabsorption de la bilirubine est possible à partir du tube digestif par activation du cycle entérohépatique [69].

## CHAPITRE II : LES INTERFERENCES ANALYTIQUES EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DES PROTEINES SERIQUES

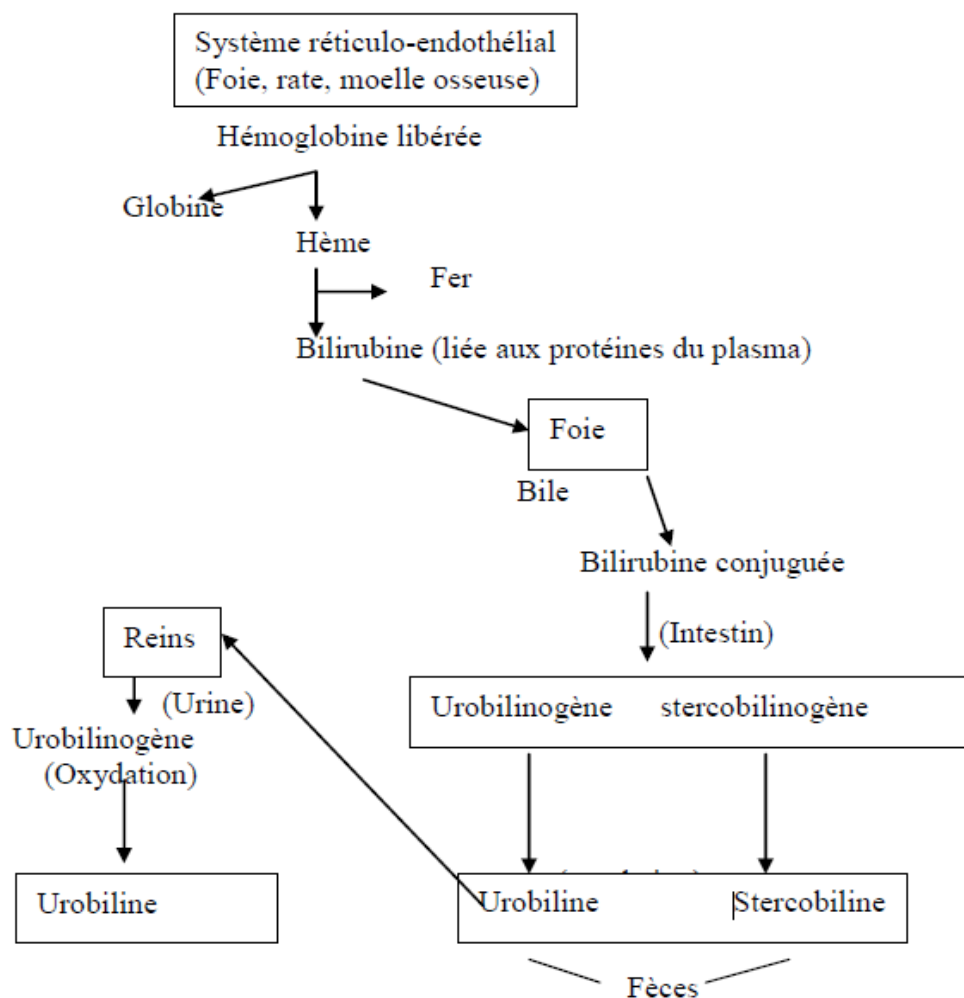


Figure 18: Métabolisme de la bilirubine (Dr A. Cortey).

### 3.3. Variations pathologiques et physiologiques de la bilirubine

#### 3.3.1. Variations pathologiques

- **Ictère**

Un ictère ou « jaunisse » est la traduction clinique d'une augmentation de la bilirubine conjuguée ou non conjuguée. Caractérisé par une coloration jaune des téguments.

L'ictère apparaît lorsque la bilirubinémie dépasse  $40\mu\text{mol/l}$ . Un ictère léger, ou débutant, est visible au regard de la sclère oculaire, endroit le plus clair des téguments.

Il existe trois grands types d'ictère : l'ictère à bilirubine libre, l'ictère à bilirubine conjuguée et l'ictère mixte. Le plus fréquent est l'ictère à bilirubine libre (ou non conjuguée) [70].

## **CHAPITRE II : LES INTERFERENCES ANALYTIQUES EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DES PROTEINES SERIQUES**

---

### **3.3.2. Variations physiologiques**

- **Production augmentée de la bilirubine en période néonatale**

Dans les premiers jours de vie, la production de la bilirubine est augmentée. Celle-ci est le reflet d'une polyglobulie physiologique chez le nouveau-né associée à une durée de vie diminuée des érythrocytes, mais aussi à l'activité importante de l'hème oxygénase. La production de bilirubine chez un nouveau-né est estimée à 8,5 mg/kg/24 h, soit deux à trois fois plus élevée que chez l'adulte.

- **Élimination diminuée de la bilirubine en période néonatale**

A cette production augmentée s'ajoute une élimination diminuée de la bilirubine dans les premiers jours de vie impliquant une conjugaison hépatique diminuée du fait :

- de l'immaturation hépatique : l'activité de la glycuronyl-transférase débute après la naissance et dépend de la qualité et de la quantité d'alimentation,
- d'un cycle entéro-hépatique augmenté,
- et d'une élimination digestive diminuée.

L'ictère dit « physiologique » du nouveau-né est le reflet d'un déséquilibre d'adaptation, entre cette production de bilirubine augmentée et cette élimination de la bilirubine diminuée, se traduisant par un excès de bilirubine non conjuguée ou libre dans le sang. Il se manifeste généralement vers le deuxième ou troisième jour de vie de l'enfant, avec un pic entre le quatrième et le cinquième jour et régresse à la fin de la première semaine de vie [71, 72,73].

### **3.4. L'interférence de la bilirubine sur l'électrophorèse capillaire des protéines sériques**

La bilirubine totale est réputée sans conséquence au niveau du protéinogramme issu d'une électrophorèse capillaire des protéines sériques [74] mais des expériences ont démontré que la fixation de la bilirubine conjuguée sur l'albumine entraîne légèrement une modification du tracé électrophorétique soit par un étirement de la fraction de l'albumine du côté anodique, soit par l'apparition d'une fraction supplémentaire bien individualisée [75].

## CHAPITRE II : LES INTERFERENCES ANALYTIQUES EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DES PROTEINES SERIQUES

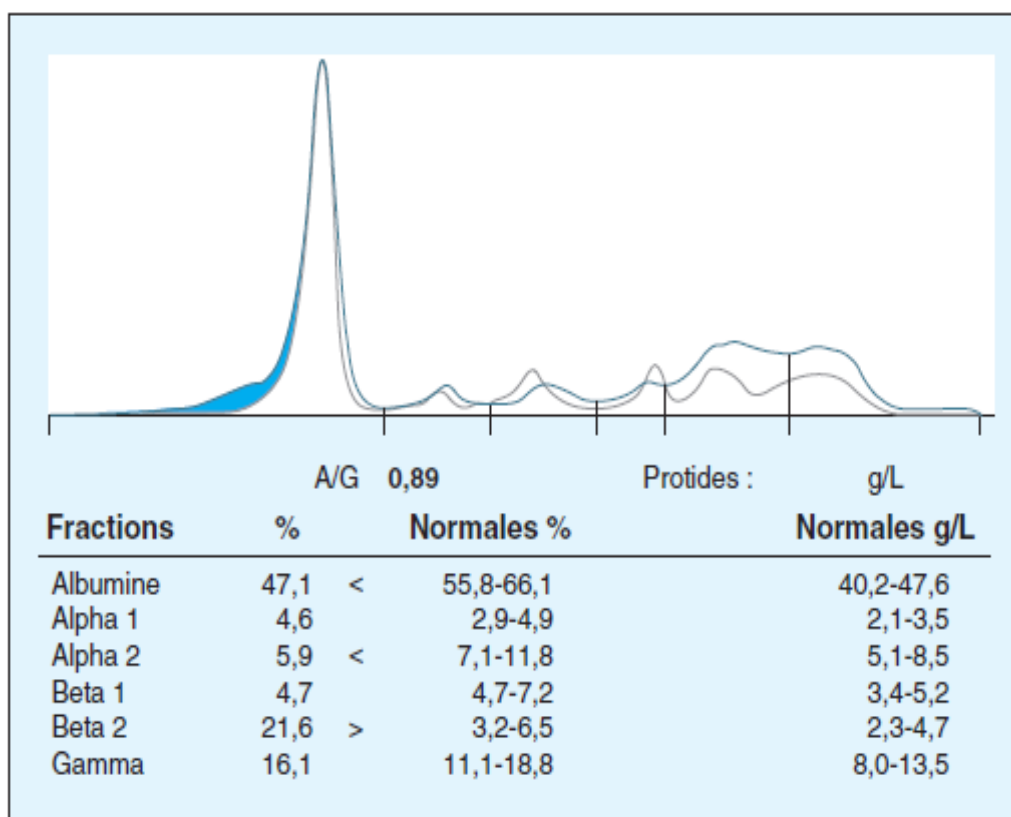


Figure 19 : Profil électrophorétique d'un sérum ictérique.

### 4. Autres interférences sur l'électrophorèse capillaire des protéines sériques

L'interprétation de l'électrophorèse peut être gênée par plusieurs autres interférences analytiques qui peuvent provenir à la fois de substances endogènes et de composés exogènes sous forme de thérapies médicales.

#### 4.1. Interférence d'origine endogène

##### 4.1.1. L'hyperlipémie

La réalisation d'une électrophorèse sur un échantillon lactescent peut avoir des impacts sur l'interprétation du tracé électrophorétique.

En effet, tous les composés de nature lipidique (cholestérols et triglycérides) sont déplacés au niveau même du pic de l'albumine. Il en résulte une majoration de la concentration de l'albumine ce qui rend impropre la mesure de l'albumine dans ces cas [76].

## **CHAPITRE II : LES INTERFERENCES ANALYTIQUES EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DES PROTEINES SERIQUES**

---

### **4.1.2. Anticorps anti-animaux**

Un autre type d'interférence endogène peut être trouvé sous la forme d'anticorps humains anti-animaux (HAAAs). Les HAAAs se forment généralement après exposition à des protéines animales, soit par manipulation des animaux ou par traitement médical (vaccination, traitement par immunoglobulines animales).

En plus des HAAAs, il existe également des anticorps hétérophiles qui sont des immunoglobulines de classe IgM qui réagissent de manière croisée avec de multiples antigènes avec une faible affinité, typiquement sans exposition préalable à des protéines animales spécifiques. Les HAMAs et les anticorps hétérophiles sont non pathologiques mais au cours d'une électrophorèse des protéines sériques ils peuvent simuler un pic étroit au niveau de la zone gamma orientant vers une gammopathie monoclonale [77,78].

### **4.2. Interférence d'origine exogène**

#### **4.2.1. Produits de contraste**

Comme l'électrophorèse est basé sur la détection des liaisons peptidiques à 200 nm à ultraviolet, tous les agents radio-opaques absorbant à la même longueur d'onde peuvent être observée par SPS. En effet, quand un échantillon de sang est recueilli après avoir effectué une injection de colorant de contraste, un pic supplémentaire, une distorsion, une modification ou une augmentation d'une fraction peut se produire, simulant la présence d'un composant monoclonal. De nombreux agents radio-opaques ont été décrits, interférant dans la fraction  $\alpha$ 2-globuline ou moins fréquemment la fraction  $\beta$ 2-globuline [79,80].

#### **4.2.2. Antibiotiques et antifongiques**

Les antibiotiques sont des substances qui ont la propriété d'inhiber ou d'atténuer la multiplication des bactéries. Il en existe plusieurs classes au sein desquelles tous ceux qui absorbent entre 200 et 214 nm, constituent des interférences qui selon leur mobilité électrophorétique seront source de confusion avec une Ig monoclonale (rifadin)

La Pipéracilline associée à la tazobactam est susceptible d'induire un pic supplémentaire entre la fraction  $\alpha$ 2-  $\beta$ 1-globuline [81,82].

La 5-Fluorocytosine (5-FC) a récemment montré une interférence avec la SPE à la fin de la fraction  $\gamma$ -globuline simulant une composante monoclonale [83].

## **CHAPITRE II : LES INTERFERENCES ANALYTIQUES EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DES PROTEINES SERIQUES**

---

Ces interférences sont plus susceptibles de se produire lorsque des échantillons de sang sont recueillis plus près du temps de perfusion, en particulier dans le contexte de l'insuffisance rénale.

### **4.2.3. Produits de remplissage**

Le remplissage vasculaire est une méthode consistant à perfuser un soluté de remplissage par l'intermédiaire d'une voie veineuse pour lutter contre une chute du débit sanguin, afin de maintenir la pression artérielle et d'assurer le transport de l'oxygène aux tissus [84].

Parmi les différents produits, les substituts plasmatiques à base de gélatine induisent une augmentation de la fraction  $\gamma$ -globuline, avec un schéma polyclonale décalé vers la fraction  $\beta_2$ -globuline, simulant un bloc  $\beta \gamma$  [85]. L'interférence est due à l'absorbance à 200 nm de la nature protéinique des substituts plasmatiques.

# Partie pratique

## **PARTIE PRATIQUE**

---

### **1. Type de l'étude**

Il s'agit d'une étude analytique descriptive.

### **2. Période et lieu de l'étude**

Cette étude est réalisée sur une période s'étalant de Décembre 2017 à mai 2018 au niveau du laboratoire de biochimie du CHU « NEDIR MOHAMMED » DE TIZI-OUZOU.

### **3. Matériels et Méthodes**

#### **3.1 Matériels**

##### **3.1.1 Matériels biologiques**

- les échantillons :

Notre étude a porté sur des échantillons sanguins des patients prélevés au niveau des différents services du CHU de Tizi-Ouzou et acheminés au niveau du service de biochimie pour exploration biochimique et immunologique.

Ces prélèvements sont obtenus par ponction veineuse en général au pli du coude, sur des patients à jeun.

Aucun critère d'inclusion et d'exclusion n'a été retenu pour la sélection des échantillons sauf en cas d'un échantillon hémolysé celui-ci est exclu de l'étude.

- Appareillages:
  - CAPILLARYS ® 2 FLEX PIERCING (SEBIA)



**Figure 20:** Automate CAPILLARYS ® 2 FLEX PIERCING (SEBIA)

## **PARTIE PRATIQUE**

---

- Architect ci 4100 abbott ® ;



**Figure 21:** Automate ARCHITECT CI 4100 ABBOTT ®

- Centrifugeuse de 5ml.



**Figure 22:** Centrifugeuse HETTICH UNIVERSEL 320 ®

## **PARTIE PRATIQUE**

---

### **3.1.2 Matériels de laboratoire et produit chimique**

**Tableau 3** : Matériels et réactif utilisés lors de l'étude.

Matériels de laboratoire	Réactif utilisé
<ul style="list-style-type: none"><li>- Pipette à 100ml</li><li>- Tube sec</li><li>- Tube sous anticoagulant (héparine de lithium)</li><li>- Agitateur manuel en verre</li><li>- Portoir</li><li>- Micropipettes de 100ul ; 500ul et de 1000ul</li><li>- Bouchon</li><li>- Eppendorf</li><li>- Becher</li><li>- Gants</li><li>- Vortex</li><li>- Racks.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Ethanol absolu</li></ul>

## **3.2 Méthodes**

### **3.2.1 Étude de l'interférence de l'hémolyse sur l'électrophorèse capillaire des protéines sériques**

Pour étudier l'interférence de l'hémolyse en électrophorèse capillaire des protéines sériques, nous avons récupéré les prélèvements sanguins sur tube sec de 76 patients, prélevés à jeun, et acheminés au laboratoire de Biochimie pour électrophorèse des protéines sériques.

Après une étape de centrifugation à 3500 tours/ min pendant 10 min, nous avons récupéré les sérums de chaque tube.

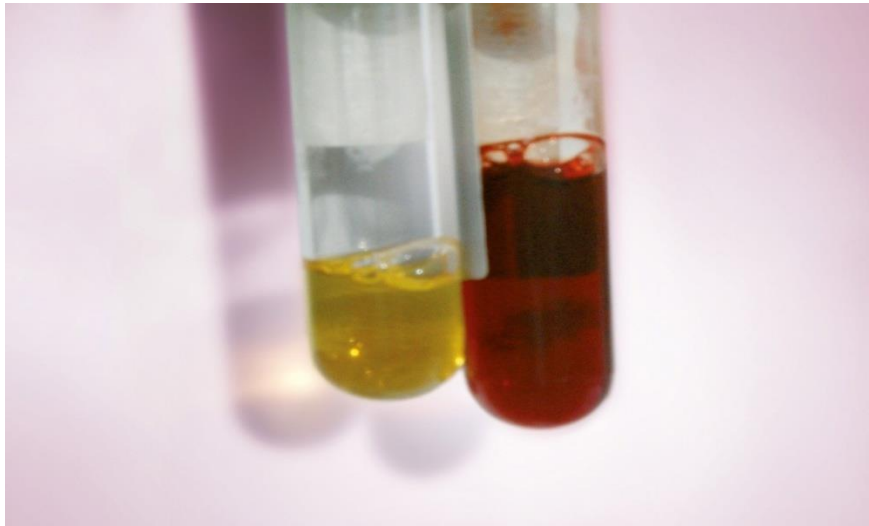
Remarque : En cas de survenue d'une hémolyse à cette étape, le tube est exclu de l'étude.

## **PARTIE PRATIQUE**

---

Après avoir récupéré de chaque tube un sérum clair, nous avons ensuite provoqué une agitation manuelle sur le tube primaire jusqu'à obtention d'une hémolyse nettement visible à l'œil nu. Une nouvelle centrifugation a été réalisée, et nous avons récupéré un sérum hémolysé.

Nous avons donc obtenu de chaque prélèvement sanguin de chaque patient, un sérum clair et un sérum hémolysé.



**Figure 23:** Représentation d'un sérum non hémolysé et d'un sérum hémolysé

Ensuite, sur chaque type de sérum (Clair et hémolysé) un dosage du taux de protides et une EPP capillaire ont été effectués :

### ❖ **Dosage du TP :**

Le dosage du taux de protides est effectué par automate ARCHITECT ci 4100 ABBOTT ®

### ✚ **Principe de la technique :**

Les polypeptides contenant au moins deux liaisons peptidiques réagissent avec le réactif biuret. En solution alcaline, l'ion cuivrique forme un complexe violet avec de l'azote protéique dont l'intensité est mesurée à 545 nm.

### ✚ **Protocole technique : voir annexe (V).**

### ❖ **EPP capillaire :**

L'électrophorèse est faite sur automate CAPILLARYS ® 2 FLEX PIERCING (SEBIA).

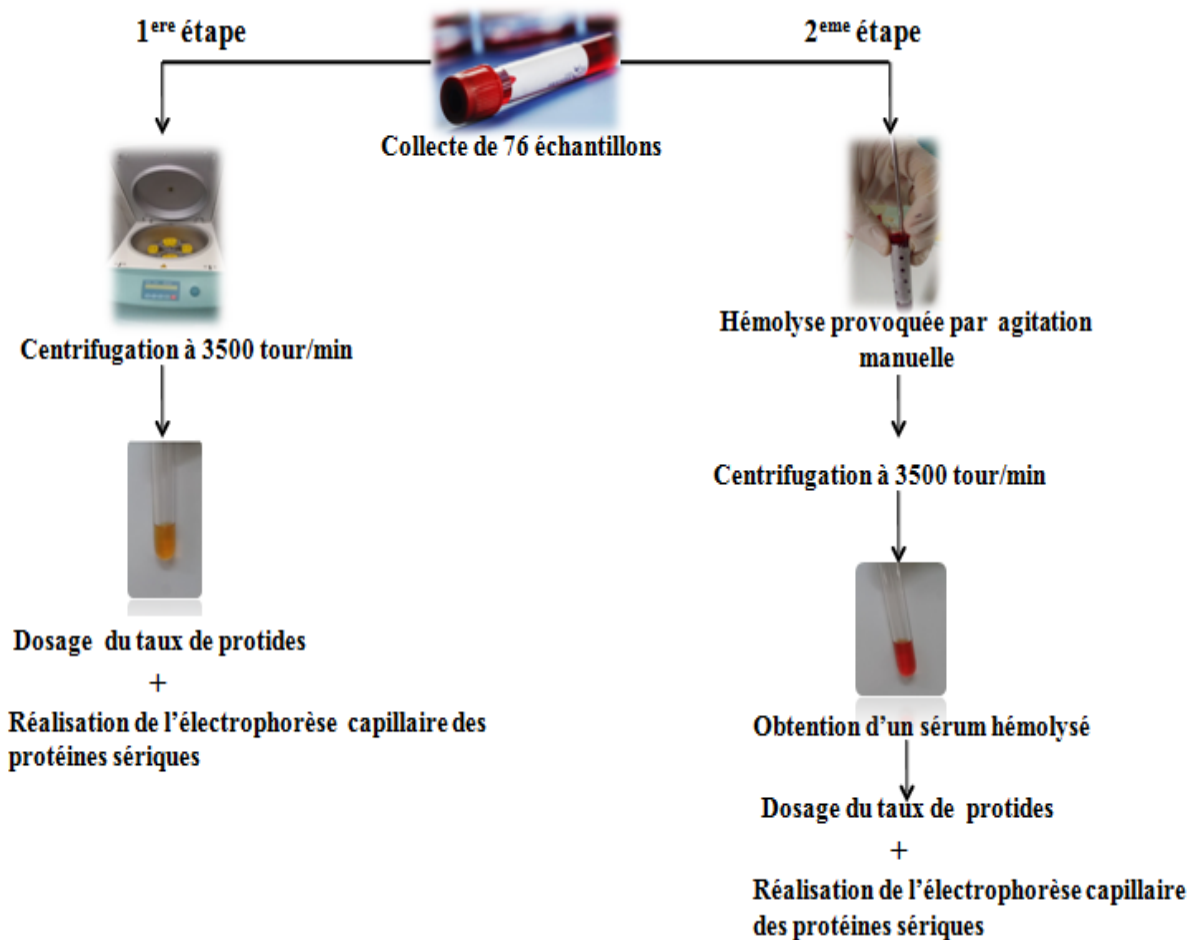
## **PARTIE PRATIQUE**

---

### **✚ Principe de la technique**

le principe utilisé est celui de l'électrophorèse capillaire en solution libre permettant la séparation de molécules chargées en fonction de leur mobilité électrophorétique propre dans un tampon de pH constant et de flux électro-osmotique plus ou moins important.

### **✚ Protocole technique : Voir annexe (IV).**



**Figure 24** : Schéma récapitulatif de la méthode d'étude de l'interférence de l'hémolyse.

### **3.2.2 Étude de l'interférence du fibrinogène sur l'électrophore capillaire des protéines sériques**

Pour l'étude de l'interférence du fibrinogène en EPP capillaire nous avons récolté les prélèvements sanguins de 30 patients :

## **PARTIE PRATIQUE**

---

Pour chaque patient, deux prélèvements ont été récupérés :

- Un prélèvement sur tube sec.
- Un prélèvement sur tube avec anticoagulant (héparinate de lithium).



**Figure 25** : Représentation d'un tube hépariné et d'un tube sec

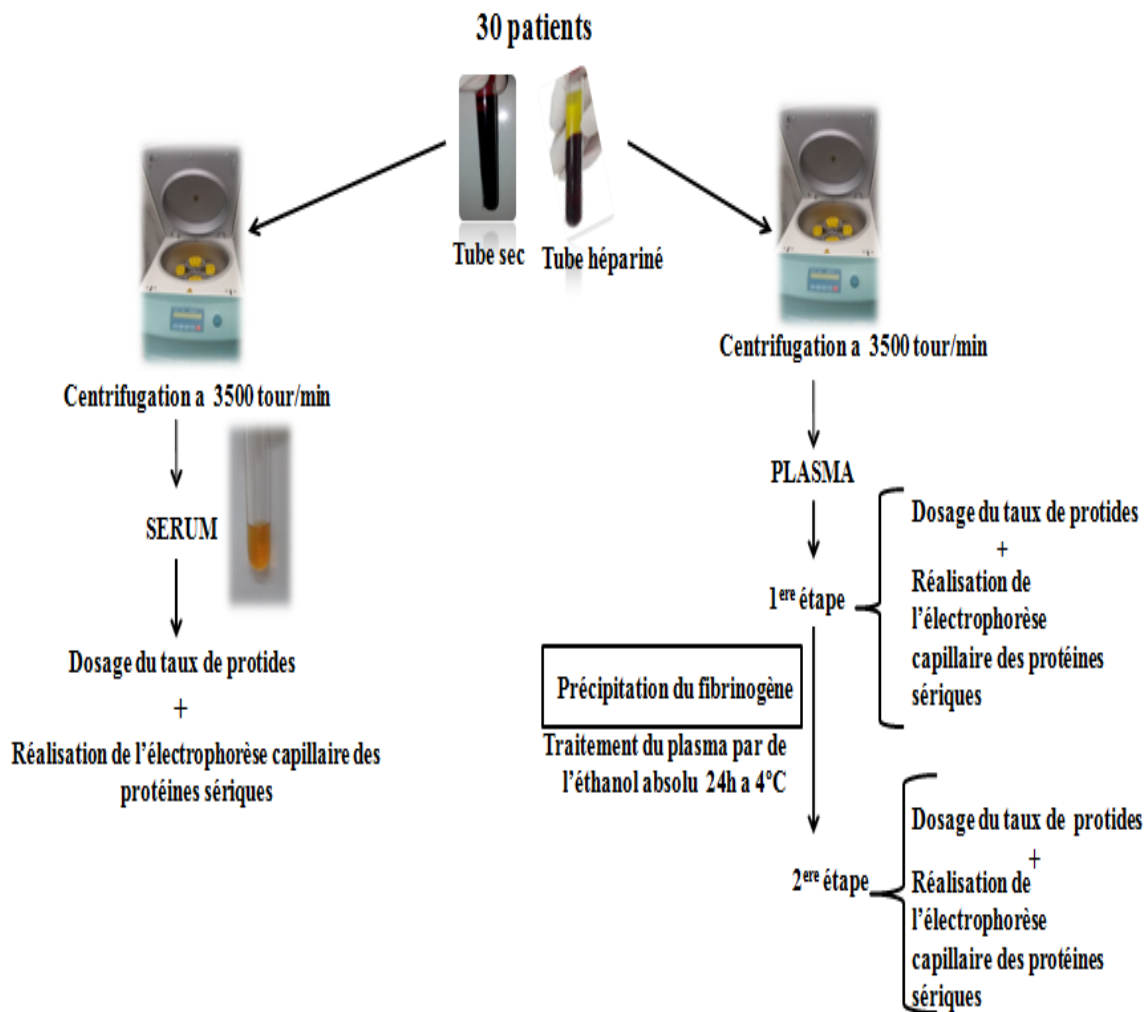
Ensuite, nous avons centrifugé à 3500 t/min pendant 10min les deux types de tubes (Sec et hépariné), à fin de récupérer pour chaque patient un sérum et un plasma.

Un dosage du taux de protides ainsi qu'une électrophorèse capillaire ont été effectués sur les deux tubes.

Par la suite, nous avons procédé à la précipitation du fibrinogène par un traitement du plasma grâce à de l'éthanol absolu selon le protocole suivant [86] :

- ✓ Diluer le plasma au 1/10<sup>ème</sup> (100 ul d'éthanol absolu pour 900ul de plasma).
- ✓ Vortexer.
- ✓ Incuber une nuit à +4°C.
- ✓ Le lendemain : Centrifugation à 1000 tours pendant 15 minutes à froid, récupération du surnageant sur des tube sec.

Une électrophorèse des protéines sériques ainsi qu'un dosage du taux de protides ont été refaits sur chaque plasma traité.



**Figure 26** : Schéma récapitulatif de la méthode d'étude de l'interférence du fibrinogène.

### 3.2.3 Étude de l'interférence de la bilirubine sur l'électrophorèse capillaire des protéines sériques

Trente-quatre échantillons ictériques ont été collectés à partir des prélèvements adressés au laboratoire de biochimie du CHU de Tizi-Ouzou. Tous les sérums obtenus après centrifugation, ont été conservés à + 4°C et à l'obscurité.

Une détermination des taux de protéides, des concentrations des bilirubines totales et directes sur automate ARCHITECT CI 4100 ABBOTT® ainsi qu'une électrophorèse capillaire des protéines sériques ont été réalisées.

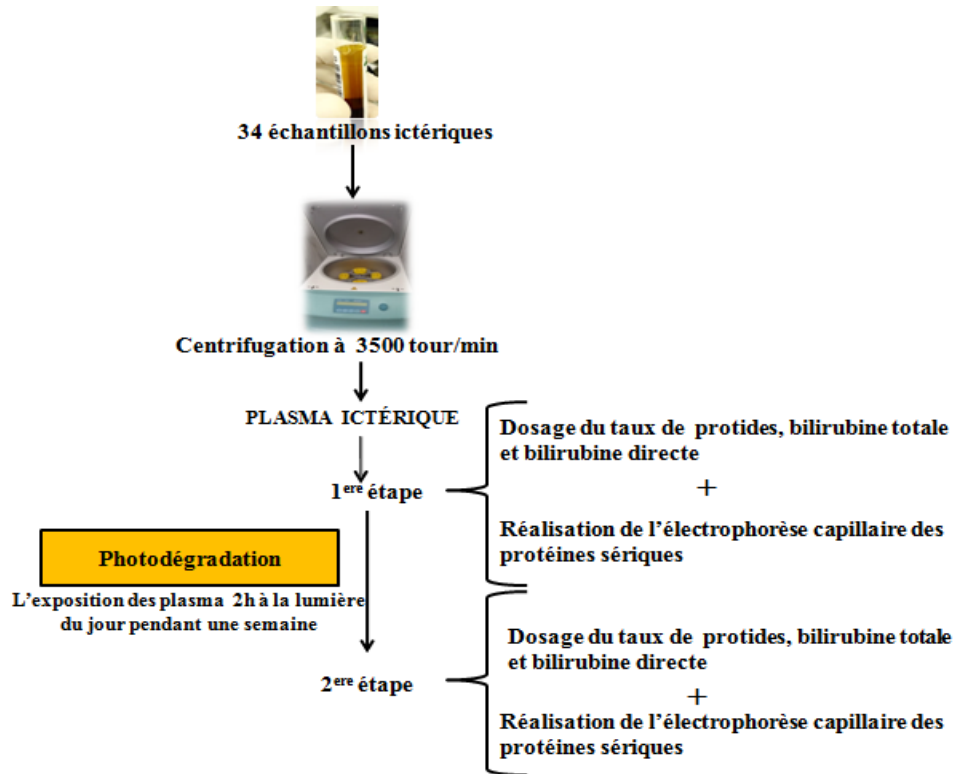
Par la suite, un traitement des échantillons pour diminuer les concentrations de bilirubine a été effectué selon le protocole suivant :

## **PARTIE PRATIQUE**

---

- Exposition des échantillons pendant 2 heures quotidiennement et durant une semaine à la lumière du jour.

Une deuxième électrophorèse capillaire a été pratiquée sur les échantillons traités ainsi qu'un dosage des taux de protides, des bilirubines totales et directes.



**Figure 27** : Schéma récapitulatif de la méthode d'étude de l'interférence de la bilirubine.

# RESULTATS

## RESULTATS

---

### 1. Analyse statistique :

- L'outil statistique utilisé est « Office Excel 2016 ».
- La présentation des données était faite sur le logiciel « Office Word 2016 ».
- les résultats sont exprimés en moyennes et écart type.
- Le Test de Student a été utilisé pour la comparaison des moyennes des taux de protéines exprimé en g/l et des cinq fractions (Albumine, alpha1 globulines, alpha2 globulines, beta globulines et Gamma globulines) exprimés en pourcentages (%).

Le seuil de significativité retenue est de 5% ce qui veut dire qu'un résultat est significative lorsque le  $P < 0.05$ .

- L'étude des Corrélations est utilisée pour déterminer l'absence ou la présence d'une relation linéaire significative entre les divers variables.
- Le test de Shapiro wilk a été calculé à partir de logiciel STHDA :

<http://www.sthda.com/french/rsthda/shapiro-wilk.php>

### 2. Vérification de la normalité de la distribution des variables

Nous avons procédé à la vérification de la normalité de la distribution de nos variables par le test de shapiro wilk

Sachant que l'hypothèse nulle est que la population est normalement distribuée, si la p-value est inférieure au niveau alpha choisi qui est de 0.05, alors l'hypothèse nulle est rejetée (on conclut que les données ne sont pas issues d'une population normalement distribuée). Si la p-value est supérieure au niveau alpha, alors on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle selon laquelle les données sont issues d'une population normalement distribuée.

Hypothèse nulle : l'échantillon suit une loi normale. Par conséquent si la p-value du test est significative l'échantillon ne suit pas une loi normale.

Les résultats sont représentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 4** : Valeur p des différents variables calculés par le test de shapiro-wilk.

<b>Variable</b>	<b>p-value pour l'étude de l'interférence de l'hémolyse</b>	<b>p-value pour l'étude de l'interférence du fibrinogène</b>	<b>p-value pour l'étude de l'interférence de la bilirubine</b>
<b>TP</b>	0.008	0.021	0.002
<b>ALB</b>	0.004	0.0003	0.004
<b>A1</b>	$2.10^{-6}$	$1,4.10^{-9}$	$5.10^{-6}$
<b>A2</b>	0.16	0.006	0.25
<b>B1</b>	0.35	0.005	0.66
<b>B2</b>	$4.10^{-13}$	$6,5.10^{-16}$	0.01
<b><math>\gamma</math></b>	$7.10^{-6}$	0.0005	0.008

Nos variables ne suivent pas la loi normale le  $P < 0.05$

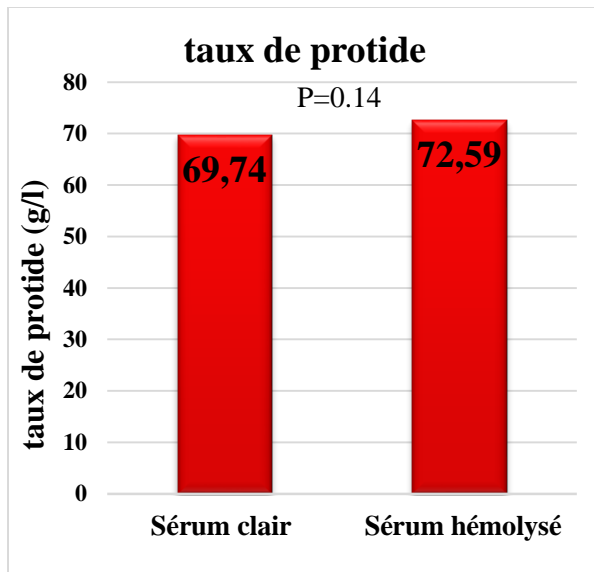
**3. Interférence de l'hémolyse sur l'électrophorèse capillaire des protéines sériques****3.1 Analyse quantitative****Tableau 5** : Comparaison de la moyenne du taux de protides et des fractions des profils électrophorétiques obtenus sur sérum clair et sur sérum hémolysé.

Fractions	Moyennes ± écartype (%)		P
	Avant hémolyse	Après hémolyse	
<b>Taux de protides g/l</b>	69,74 ± 12,03	72,59 ± 11,76	0,14
<b>Albumine (%)</b>	51,98 ± 10,31	50,49 ± 9,82	0,36
<b>Alpha 1 (%)</b>	4,86 ± 2,23	5,16 ± 2,12	0,41
<b>Alpha 2 (%)</b>	11,60 ± 3,72	12,68 ± 4,04	0,09
<b>Beta 1 (%)</b>	5,66 ± 1,03	6,48 ± 1,88	<b>0,0011</b>
<b>Beta 2 (%)</b>	6,27 ± 4,28	6,18 ± 4,41	0,89
<b>Gamma (%)</b>	19,63 ± 10,44	19,02 ± 9,83	0,71

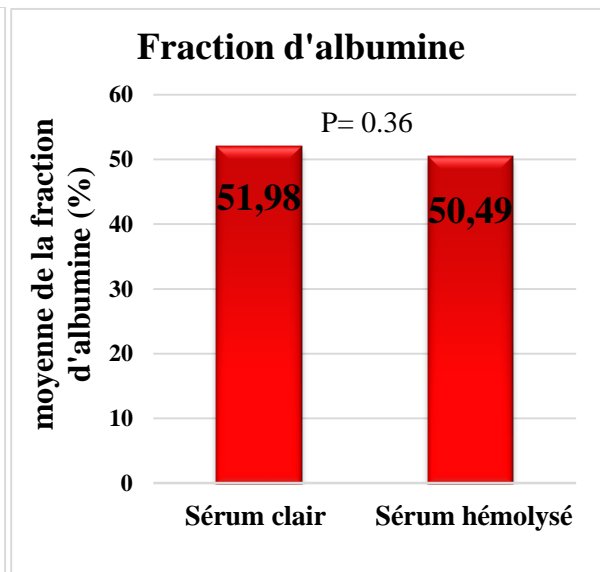
La comparaison des moyennes du taux de protides et les moyennes des différentes fractions électrophorétiques obtenues sur sérum clair et sérum hémolysé n'ont montré aucune différence statistiquement significative.

Par ailleurs, nous avons constaté que la moyenne de la fraction Béta 1 obtenue sur les tracés électrophorétiques sur sérums hémolysés est statistiquement plus élevée par rapport à celle obtenue sur sérums claires (**P=0.0011**).

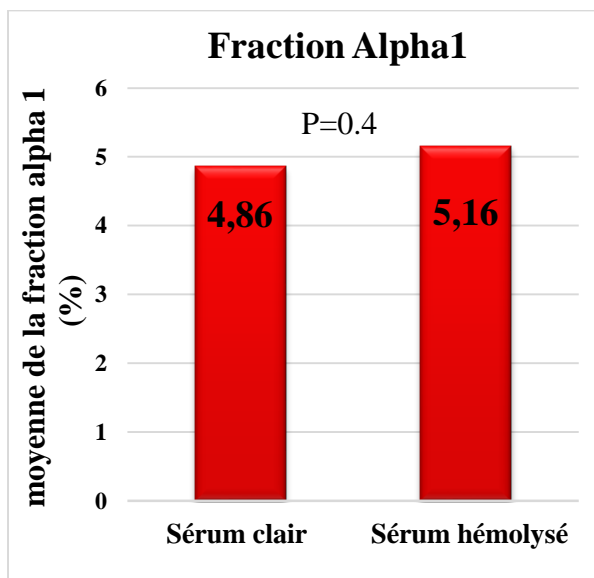
Les résultats du tableau sont illustrés sur les graphes ci-dessous.



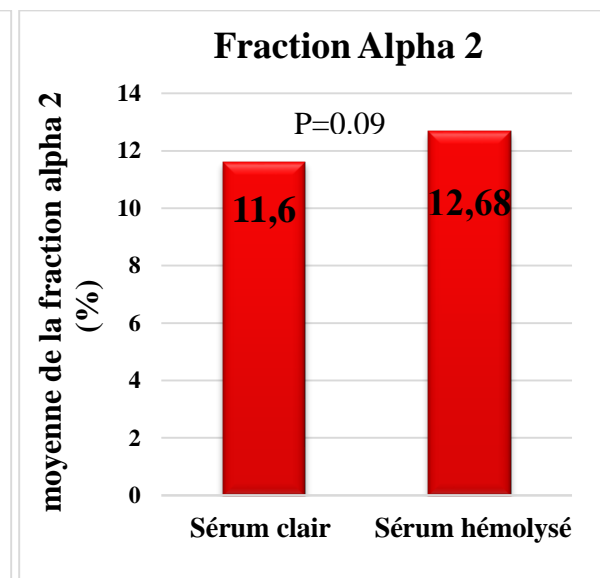
**Graphe 1:** Comparaison des moyennes des TP obtenues sur sérum clair et sur sérum hémolysé.



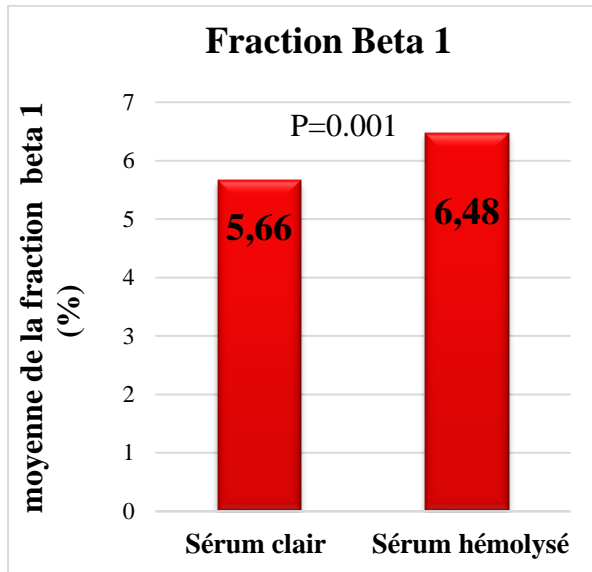
**Graphe 2:** Comparaison des moyennes d'albumine obtenues sur sérum clair et sur sérum hémolysé.



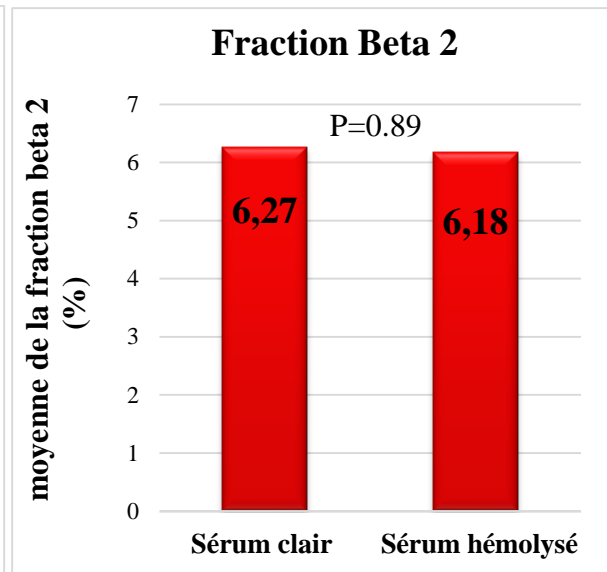
**Graphe 4 :** Comparaison des moyennes de la fraction alpha 1 obtenues sur sérum clair et sur sérum hémolysé.



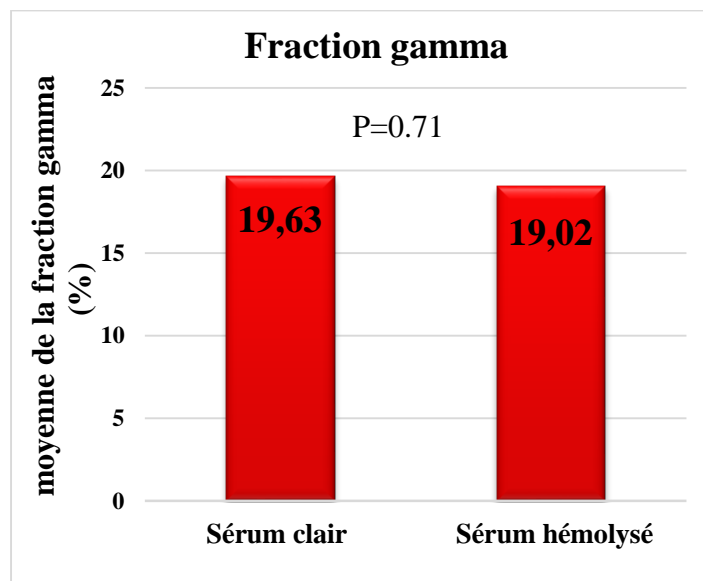
**Graphe 3 :** Comparaison des moyennes de la fraction alpha2 obtenues sur sérum clair et sur sérum hémolysé.



**Graphe 6 :** Comparaison des moyennes de la fraction beta 1 obtenues sur sérum clair et sur sérum hémolysé.



**Graphe 5 :** Comparaison des moyennes de la fraction beta 2 obtenues sur sérum clair et sur sérum hémolysé.



**Graphe 7 :** Comparaison des moyennes de la fraction gamma obtenues sur sérum clair et sur sérum hémolysé.

### 3.2 Analyse qualitative

La répartition des différentes anomalies observées sur les tracés électrophorétiques obtenus sur les échantillons hémolysés sont représenté dans le tableau suivant :

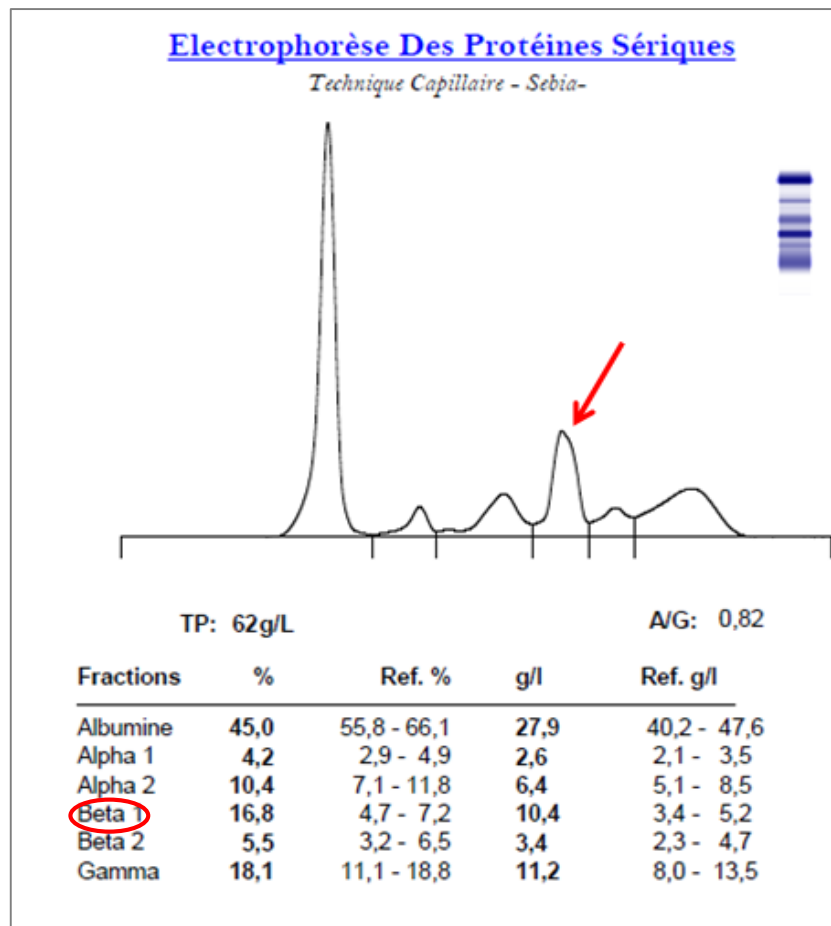
**Tableau 6** : Répartition de différentes anomalies observées sur les tracés EP hémolysés.

Anomalie observée	Nombre de patient	Pourcentages %
Sans anomalie	57	75 %
Elévation de la fraction $\beta$ 1	10	13.16 %
Déformation de la fraction $\alpha$ 2	9	11.84 %
Total	76	100%

L'analyse qualitative des tracés électrophorétiques obtenus sur sérum clair et sérum hémolysé, a mis en évidence des anomalies qualitatives décelées sur les échantillons hémolysés chez 25% des cas.

- ✚ Dans 11.84 % des cas soit 9 échantillons, des déformations au niveau de la fraction alpha 2 ont été observées.





**Figure 29** : Profil électrophorétique obtenue sur sérum hémolysé montrant une élévation de la fraction beta 1.

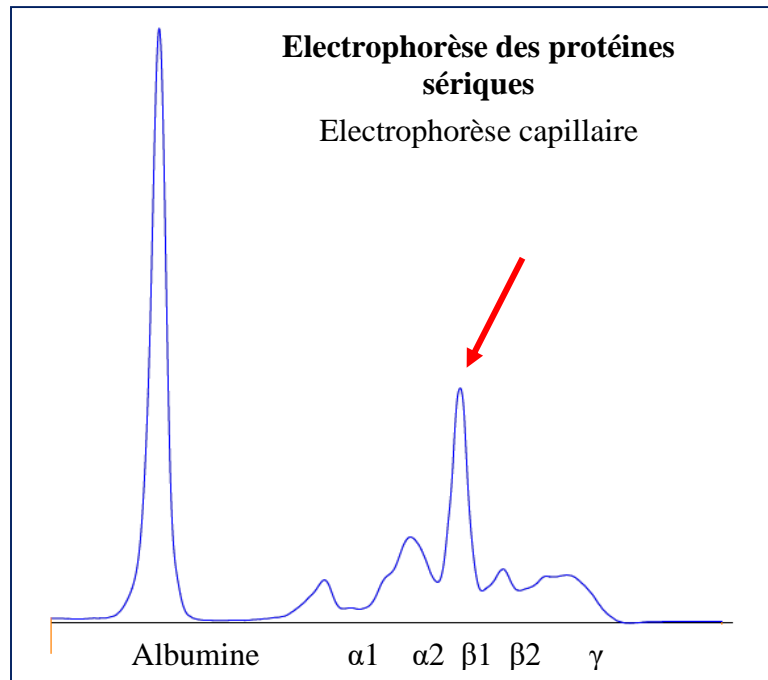
Par ailleurs aucune anomalie n'est détectée au niveau des profils électrophorétiques obtenues sur sérum hémolysés chez 75% des cas (57 échantillons).

✚ **A propos d'un cas :**

Il s'agit d'un prélèvement d'un patient hospitalisé au niveau du service d'Hématologie du CHU de Tizi-Ouzou pour l'exploration d'une leucémie lymphoïde chronique.

Une EPP a été réalisée, montrant une élévation de la fraction beta 1 d'allure monoclonale.

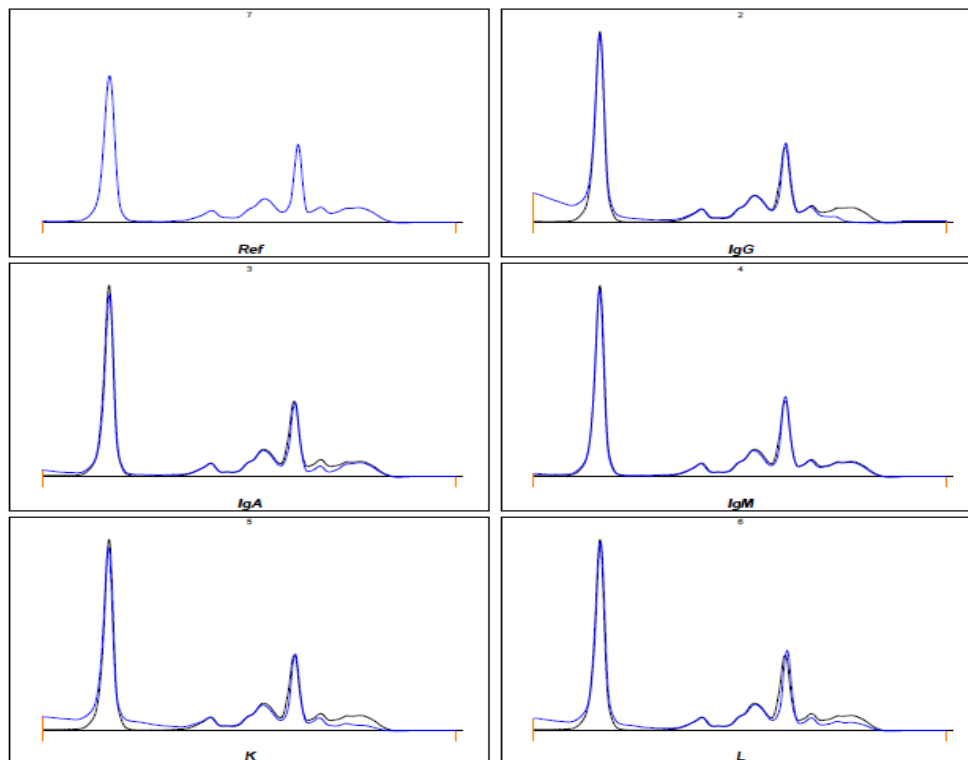
Les résultats sont illustrés dans la figure suivante :



**Figure 30** : Profil électrophorétique du patient présentant un pic d'allure monoclonale.

Devant un tel résultat et vue le contexte clinique, un immunotypage par immunosoustraction est effectué

Le résultat est représenté dans la figure suivante :



**Figure 31** : Les résultats de l'immunotypage effectué sur le sérum du patient.

## RESULTATS

Le résultat de l'immunotypage exclu la présence d'une éventuelle gammopathie monoclonale. Après analyse visuelle du sérum du patient, une hémolyse franche est constatée.

### 4. Résultats de l'étude de l'interférence du fibrinogène sur l'électrophorèse des protéines sériques

#### 4.1 Analyse quantitative

L'analyse statistique a donné les résultats représentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 7** : Résultats de la comparaison de la moyenne des différentes fractions entre les trois tubes.

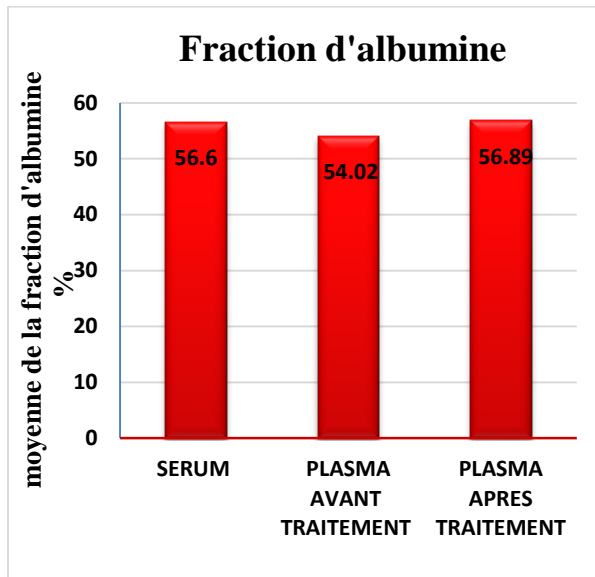
Fractions	Moyennes ± écartypes %			Comparaison sérum/plasma avant traitement	Comparaison sérum/plasma après traitement
	Sérum	Plasma avant traitement	Plasma après traitement	P	P
TP (g/l)	70.72 ±11.03	71.59 ±9.82	70.32 ±12.01	0.13	0.70
Albumine %	56.51±6.16	54,02 ±6.15	56.89±6.25	0.12	0.81
Alpha 1 %	4,67 ±1,77	4.40 ±1,7	3.99 ± 1.64	0,55	0.12
Alpha 2 %	11.18 ±2,77	10.2 ±2,38	11.1 ±2.88	0.14	0.9
Beta 1 %	6,11 ±1,65	5,79 ±1,42	6.65 ±1.93	0,43	0.23
Beta 2 %	5,72± 5.18	10,84 ± 1.92	4.69±1,19	3.10 <sup>-6</sup>	0.28
Gamma %	16,69 ±6.10	14,78 ±5.51	16,02 ±6.22	0,2	0.67

La comparaison des moyennes des différentes fractions électrophorétiques obtenues sur les trois types de tubes (sérum, plasma avant et après traitement à l'éthanol) montre une augmentation statistiquement significative de la moyenne de la fraction  $\beta_2$  sur le plasma avant traitement par l'éthanol par rapport à la moyenne de la fraction obtenue sur sérum (10.84 ±1.92 % contre 5.72 ± 5.18 % avec  $P= 3.10^{-6}$ ). Cependant cette différence n'est pas retrouvée en comparant le taux de cette fraction obtenue sur sérum et sur plasma traité par l'éthanol.

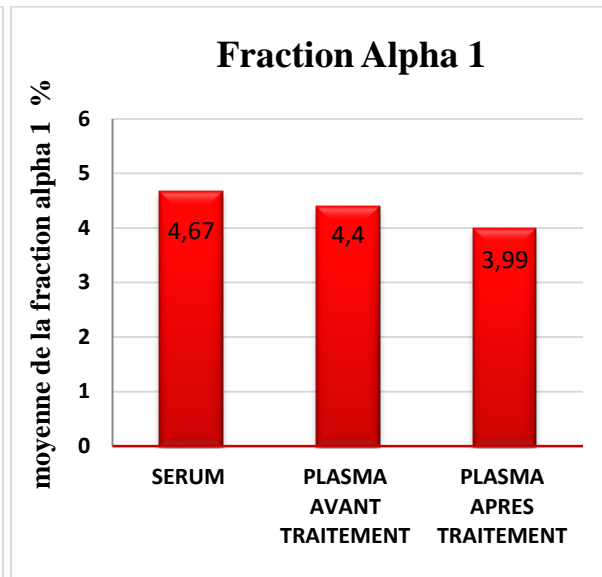
## RESULTATS

En ce qui concerne les autres fractions, aucune différence significative n'est constatée.

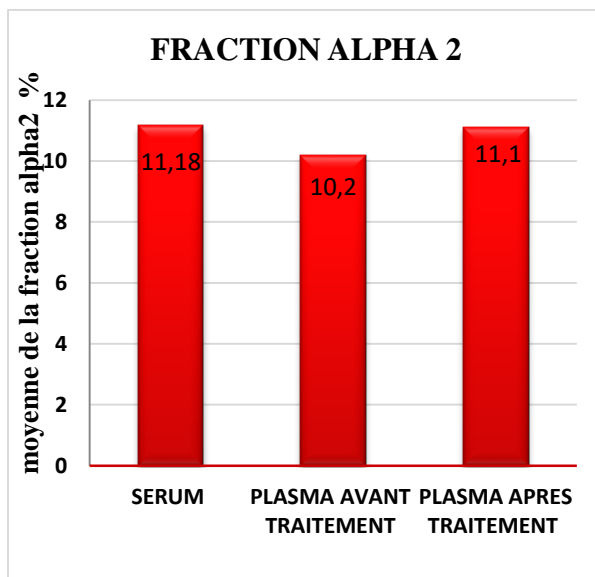
Les résultats du tableau sont illustrés sur les graphes ci-dessous :



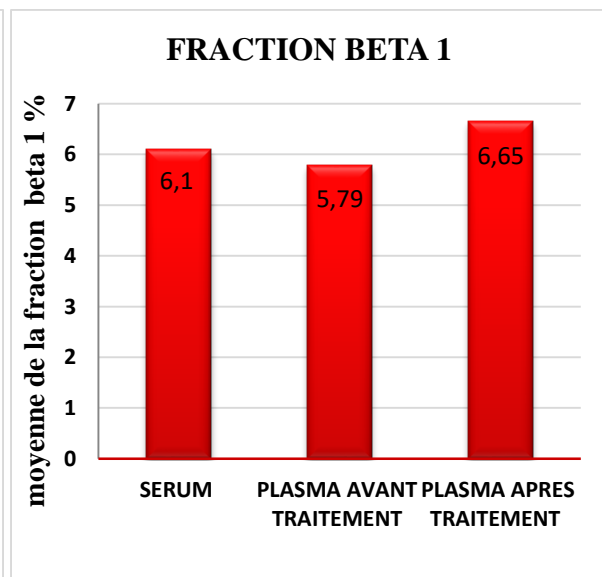
**Graphe 9 :** Représentation des moyennes de l'albumine sur sérum, plasma avant et après traitement à l'éthanol.



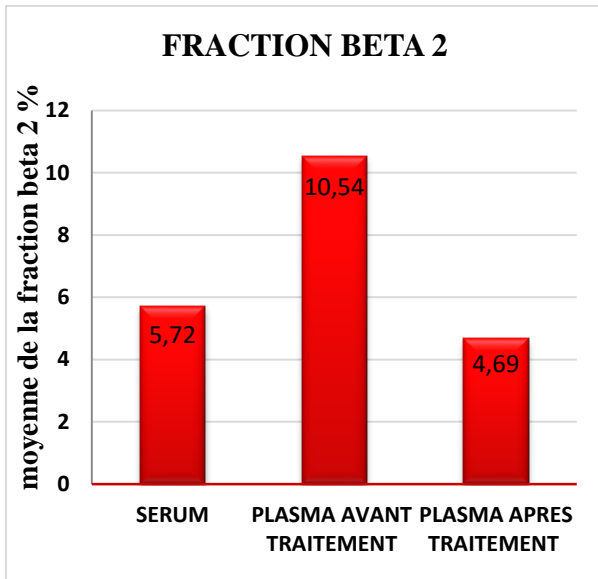
**Graphe 8 :** Représentation des moyennes de la fraction  $\alpha$  1 sur sérum, plasma avant et après traitement à l'éthanol.



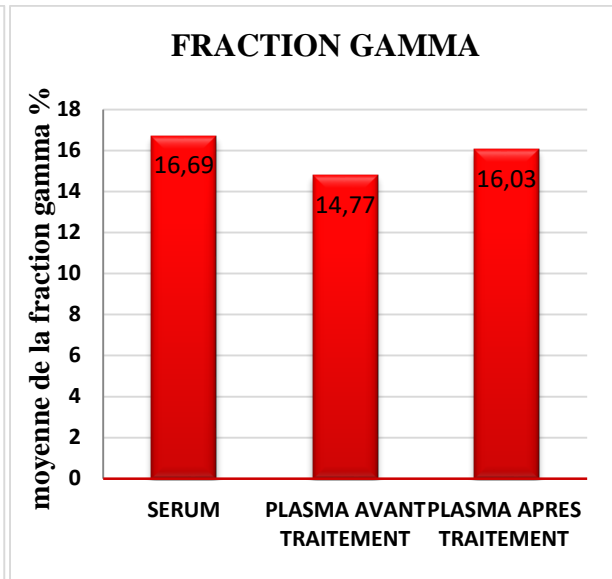
**Graphe 10 :** Représentation des moyennes de la fraction  $\alpha$  2 sur sérum, plasma avant et après traitement à l'éthanol.



**Graphe 11:** Représentation des moyennes de la fraction  $\beta$ 1 sur sérum, plasma avant et après traitement à l'éthanol.



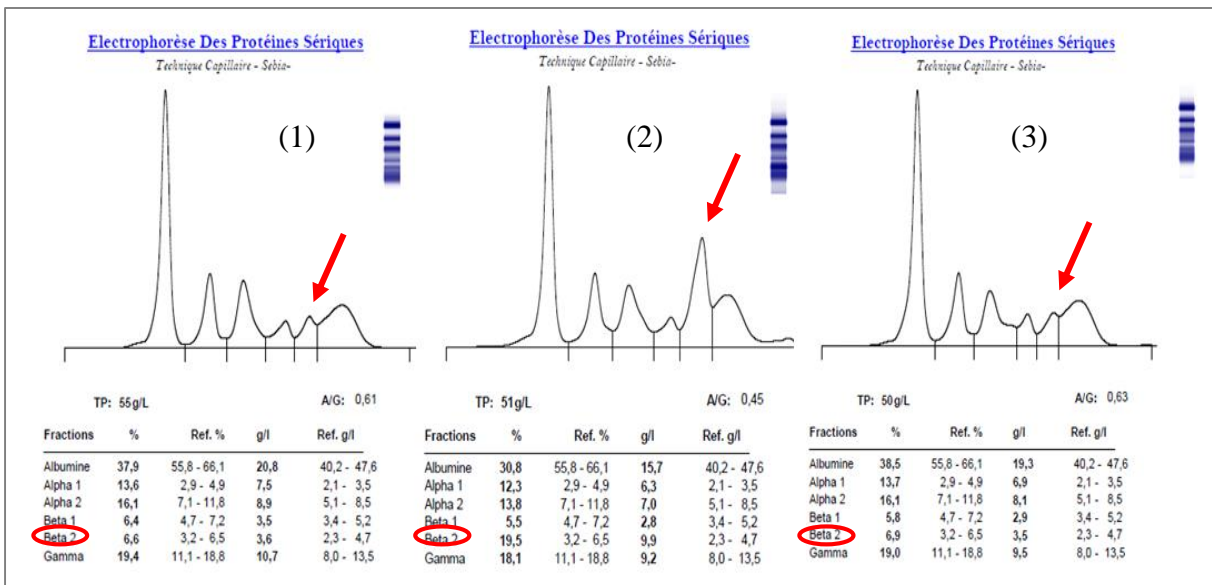
**Grphe 13:** Représentation des moyennes de la fraction  $\beta$  2 sur sérum, plasma avant et après traitement à l'éthanol.



**Grphe 12:** Représentation des moyennes de la fraction  $\gamma$  sur sérum, plasma avant et après traitement à l'éthanol.

**4.2 Analyse qualitative :**

Sur le plan qualitatif, tous les tracés électrophorétiques obtenus sur plasma (100%) montre une élévation de la fraction beta 2. Cette anomalie a disparue après traitement à l'éthanol absolu.



**Figure 32 :** Profil électrophorétique d'un sérum (1), d'un plasma avant (2) et après traitement à l'éthanol(3).

### 4.3 Etude de corrélation des moyennes sérum/plasma

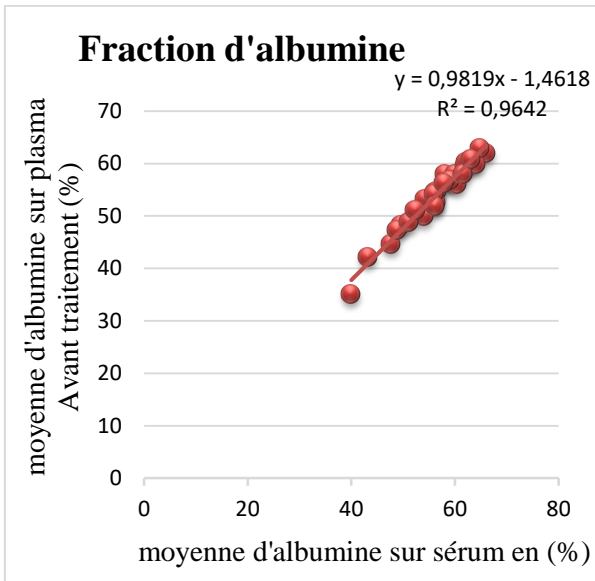
Nous avons étudié la corrélation des moyennes des différentes fractions obtenues sur sérum et sur plasma avant traitement.

Les coefficients de corrélation sont représentés dans le tableau ci-dessous :

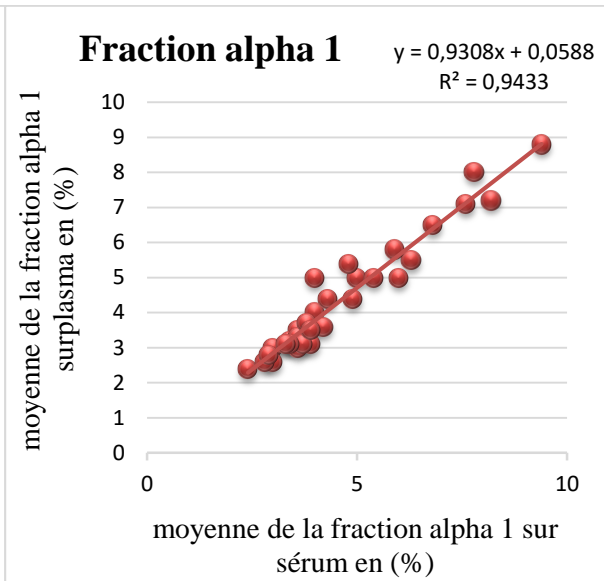
**Tableau 8** : Coefficient de corrélation entre les fractions obtenues sur sérum et celle obtenues sur plasma avant traitement à l'éthanol absolu.

Fractions corrélées	Coefficient de corrélation r
Albumine	<b>0.98</b>
Alpha 1	<b>0.97</b>
Alpha 2	<b>0.97</b>
Béta 1	<b>0.94</b>
Béta 2	<b>0.10</b>
Gamma	<b>0.99</b>

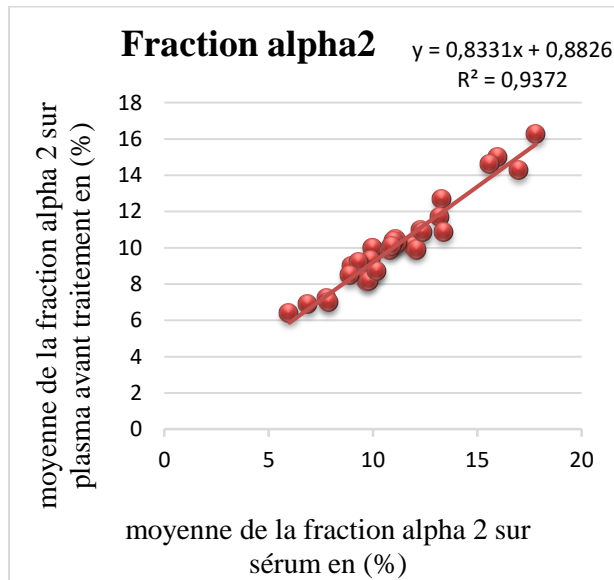
Les résultats sont illustrés dans les graphes suivants :



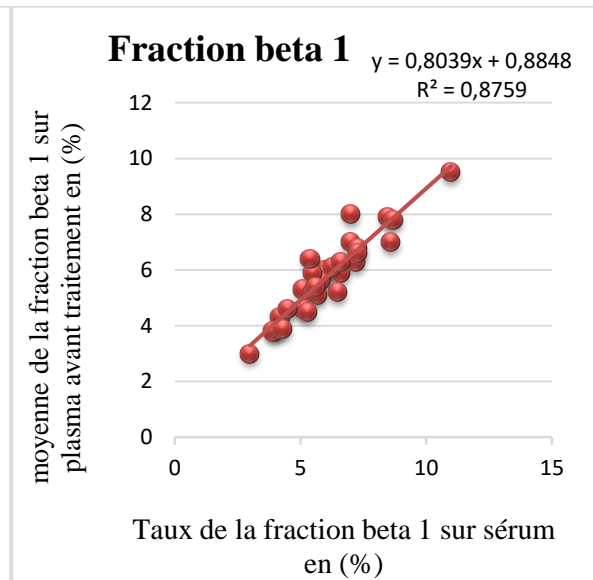
**Graphe 15 :** Corrélation des moyennes de l'albumine sur sérum / plasma.



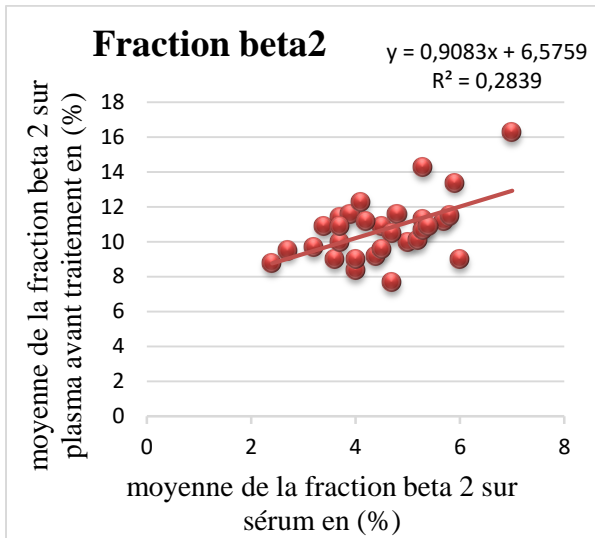
**Graphe 14 :** Corrélation des moyennes de la fraction  $\alpha 1$  sur sérum / plasma.



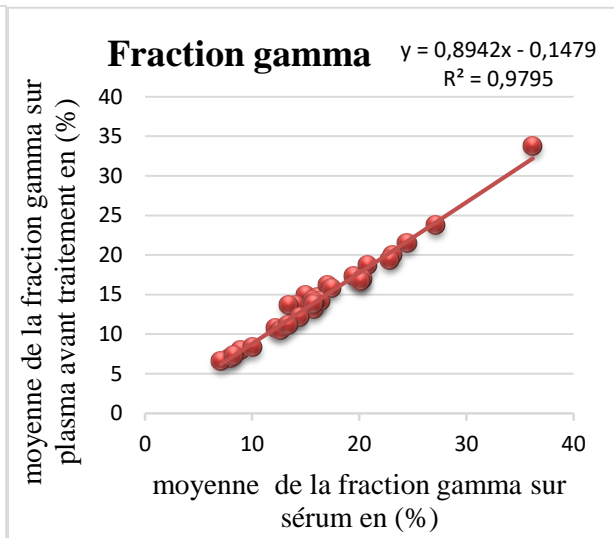
**Graphe 17 :** Corrélation des moyennes de la fraction  $\alpha 2$  sur sérum / plasma.



**Graphe 16:** Corrélation des moyennes de la fraction  $\beta 1$  sur sérum / plasma.

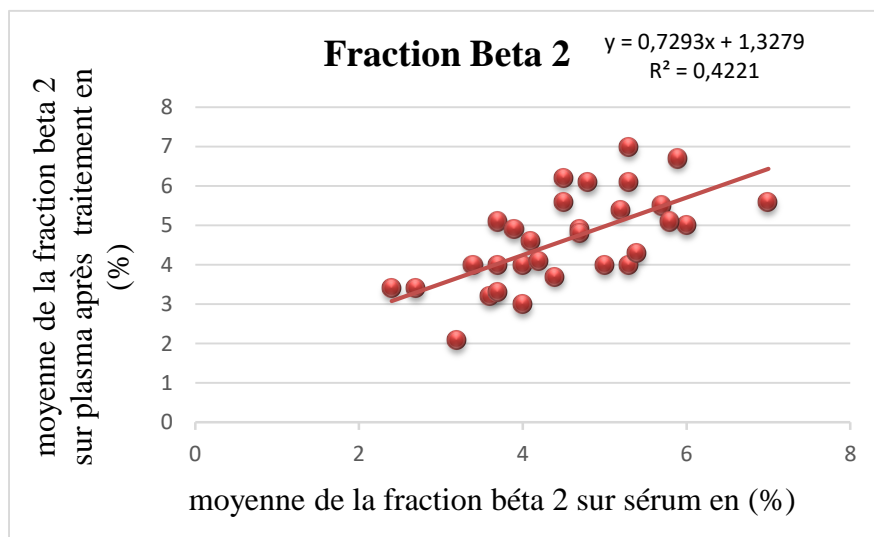


**Graphe 19:** Corrélation des moyennes de la fraction  $\beta 2$  sur sérum / plasma.



**Graphe 18:** Corrélation des moyennes de la fraction  $\gamma$  sur sérum / plasma.

Ces résultats montrent une très bonne corrélation entre les moyennes des fractions obtenues sur sérum et sur plasma sauf en ce qui concerne la fraction beta 2 avec un  $r = 0.10$ . Cependant, malgré le traitement du fibrinogène par de l'éthanol, la corrélation entre les moyennes de la fraction  $\beta 2$  obtenus sur sérum et celle sur plasma après ce traitement reste faible ( $r = 0.21$ ).



**Graphe 20 :** Corrélation des moyennes de la fraction beta 2 sur sérum / plasma après traitement à l'éthanol.

## RESULTATS

### 5. Résultats de l'étude de l'interférence de la bilirubine sur l'électrophorèse des protéines sériques

#### 5.1 Analyse quantitative

Nous avons réalisé une analyse quantitative en comparant les résultats obtenus avant et après traitement (photo dégradation de la bilirubine) des échantillons collectés. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau ci-dessous

**Tableau 9** : Comparaison des moyennes avant et après photodégradation.

FRACTIONS	Moyennes $\pm$ écarts types		P
	Avant photodégradation	après photodégradation	
Taux de protides (g/l)	60.12 $\pm$ 9.46	65.15 $\pm$ 12.57	0.07
Albumine %	54.85 $\pm$ 7.04	55.04 $\pm$ 7.35	0.91
Alpha 1 %	4.76 $\pm$ 2.42	4.78 $\pm$ 2.21	0.96
Alpha 2 %	9.39 $\pm$ 2.29	9.93 $\pm$ 2.56	0.36
Beta 1 %	5.13 $\pm$ 1.17	5.33 $\pm$ 1.28	0.50
Beta 2 %	10.63 $\pm$ 3.35	9.33 $\pm$ 3.73	0.14
Gamma%	15.21 $\pm$ 6.80	15.55 $\pm$ 6.73	0.84
Bilirubine totale (mg/l)	84.14 $\pm$ 91.45	41.40 $\pm$ 52.75	<b>6,3.10<sup>-6</sup></b>
Bilirubine directe (mg/l)	36.63 $\pm$ 59.94	15.48 $\pm$ 28.01	<b>0.001</b>
Bilirubine indirecte (mg/l)	47.5 $\pm$ 55.3	25.90 $\pm$ 30.26	<b>0.002</b>

Les résultats obtenues montre qu'après photodégradation une diminution statistiquement significative du taux de la bilirubine totale, directe, libre a été constatée avec des p-value respective **P=6,3.10<sup>-6</sup>, P= 0.001, P=0.002.**

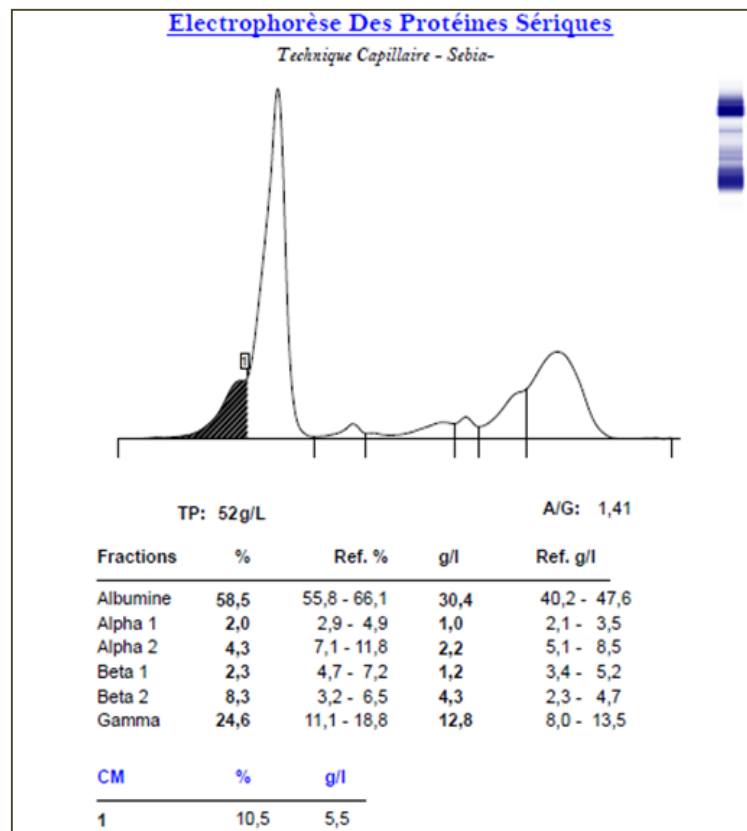
## RESULTATS

Par ailleurs, aucune différence statistiquement significative n'est observée en ce qui concerne les moyennes des différentes fractions électrophorétiques ainsi que le taux de protides (Albumine :  $P=0.91$ ,  $\alpha 1$  :  $P= 0.96$ ,  $\alpha 2$  :  $P= 0.36$ ,  $\beta 1$  :  $P=0.5$ ,  $\beta 2$  :  $P=0.14$ ,  $\gamma$  :  $P=0.84$ ).

### 5.2 Analyse qualitative :

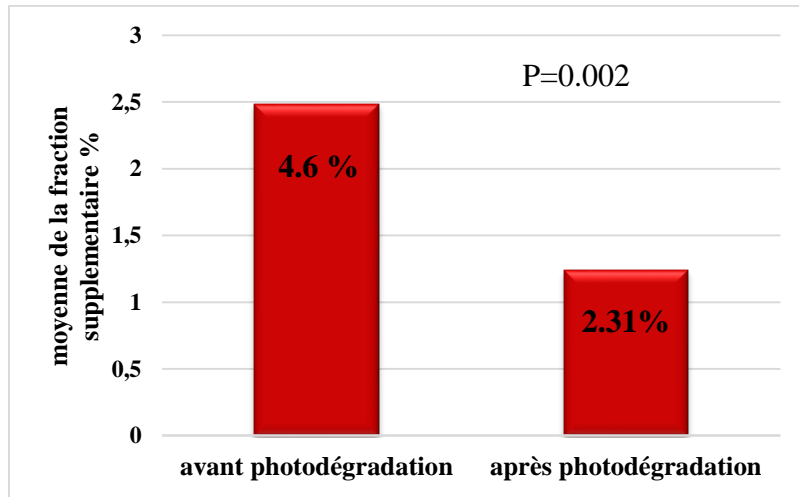
Les profils électrophorétiques de 79.4 % des échantillons ictériques (27 prélèvements) n'ont pas montré d'anomalies évidentes.

L'analyse quantitative des tracés électrophorétiques obtenues sur échantillons ictériques nous a permis de constater la présence d'une anomalie sous forme d'une fraction supplémentaire en pré ou en post albumine, cette anomalie est retrouvée chez 7 échantillons (20.5%).



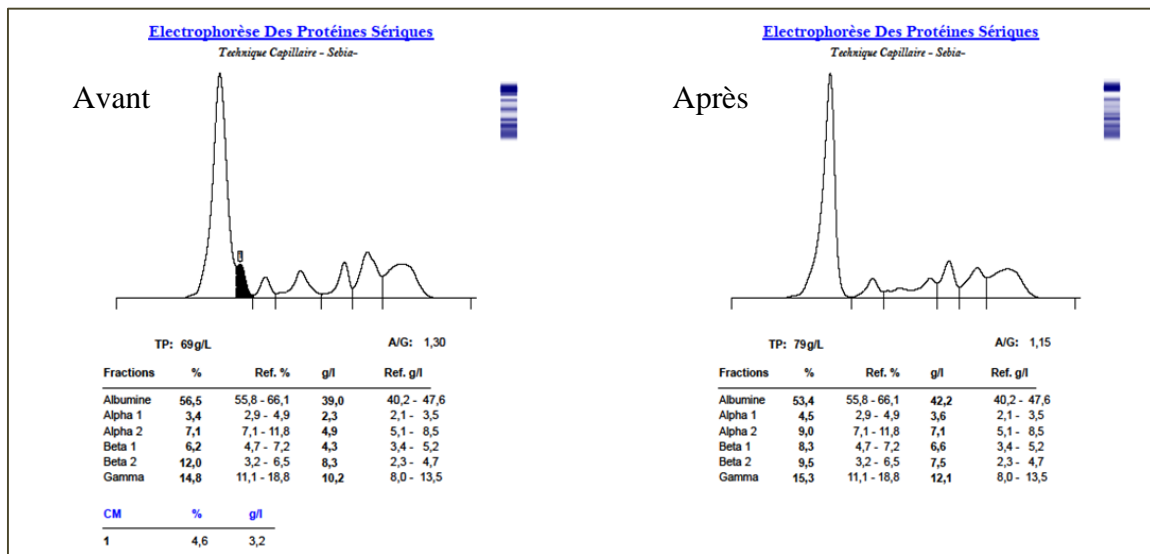
**Figure 33** : Tracé électrophorétique représentant une anomalie en pré albumine.

La moyenne de cette fraction supplémentaire est de 4.6% avant photodégradation. Cependant elle a diminuée de façon significative à une valeur de 2.31% avec un  $P=0.002$  après photodégradation. Les résultats sont illustrés dans le graphe ci-dessous



**Graphe 21** : Représentation des moyennes de la fraction supplémentaire avant et après photodégradation.

En effet après photodégradation la fraction supplémentaire a disparue sur 3 des échantillons et diminuée sur les 4 autres échantillons.



**Figure 34** : Représentation d'un tracé électrophorétique avant et après photodégradation.

# DISCUSSION

## DISCUSSION

---

L'électrophorèse des protéines sériques est devenue de nos jours un examen très demandé, de fait de son importance au diagnostic et le suivi de nombreuses pathologies.

Cet examen peut être influencé, à l'image de la plus part des paramètres biologiques, par de nombreuses interférences analytiques dont les trois interférences, objet de ce travail : Hémolyse, Fibrinogène et Bilirubine.

Du fait de sa fréquence (Soit 10% des prélèvements sanguins), l'hémolyse reste plus que jamais un problème d'actualité dans les laboratoires d'analyses. Elle est parfois le résultat d'une maladie ; Mais le plus souvent est due au traitement pré analytique de l'échantillon (Prélèvement traumatique, agitation excessive, centrifugation inadéquate...).

D'après les résultats de cette étude, même si elle n'a pas influencé le taux de protides ni les taux de la plus part des fractions électrophorétiques, l'hémolyse a influencé la qualité des tracés électrophorétiques chez 25% des patients :

Chez 13.16% des patients l'anomalie qualitative est en fait une déformation de la fraction alpha<sub>2</sub> ; Ceci peut être expliqué par la migration de l'Hb libre à ce niveau, et sa liaison avec l'haptoglobine. Le complexe Hb-Haptoglobine est à l'origine de cette déformation [87].

Chez 11.84 % des patients, l'hémolyse a induit une élévation de la fraction B1, constatée sur le plan quantitatif par une moyenne plus élevée de cette fraction obtenue sur sérum hémolysé.

Les résultats de cette étude semblent être concordants avec ceux de l'étude de Benlakehal et al [88].

Cette interférence peut donc influencer l'interprétation du tracé électrophorétique, du moment qu'elle induit une élévation du taux de la fraction alpha 2, situation retrouvée essentiellement dans les syndromes inflammatoires.

D'autre part l'élévation du taux de la fraction B1 provoquée par l'hémolyse, peut être interprétée comme étant un pic monoclonal ce qui va nous pousser à réaliser à tort un immunotypage.

Il convient donc, en pratique, d'instaurer une étape de vérification de la qualité du sérum, à fin de détecter les échantillons dont les tracés peuvent être influencés par l'hémolyse.

Et du moment que l'hémolyse influence essentiellement les fractions alpha 2 et B1 du tracé électrophorétique, il est essentiel de prendre cette notion en considération en interprétant un profil électrophorétique issu d'un sérum hémolysé.

## DISCUSSION

---

La décision de valider ou de rejeter le résultat et donc la demande d'un autre prélèvement, est influencée surtout par le degré de l'interférence rendant le profil ininterprétable et par le contexte clinique de la demande.

Le prélèvement sur tube sec est le prélèvement sanguin utilisé pour la réalisation des électrophorèses des protéines sériques, car il permet d'éviter l'interférence du fibrinogène, souvent rencontrée en cas d'utilisation d'un prélèvement sanguin avec anti coagulant, ou en cas d'un prélèvement sanguin sur tube sec chez un patient sous traitement anti coagulant [76].

Dans la routine actuelle des laboratoires, on assiste de plus en plus à l'utilisation de prélèvements avec anti coagulant, surtout l'héparinate de lithium.

Dans cette étude nous avons voulu mettre le point sur l'interférence du fibrinogène en électrophorèse capillaire des protéines sériques, et du coup, de déterminer la possibilité d'utiliser le plasma hépariné comme échantillon pour la réalisation des électrophorèses des protéines sanguines.

Selon les résultats obtenus, le fibrinogène interfère seulement avec la fraction B2 du tracé électrophorétique ; Et l'anomalie constatée est une élévation significative du taux de cette fraction au niveau du profil électrophorétique plasmatique, alors que les taux des autres fractions avec le taux de protides (obtenus sur plasma), n'ont montré aucune différence par rapport à ceux obtenus sur sérum.

Afin d'avoir la preuve que cette augmentation du taux de la fraction B2 est liée à la présence du fibrinogène, nous avons procédé à la précipitation de ce dernier par de l'éthanol absolu.

Les résultats obtenus après traitement du plasma par de l'éthanol absolu montrent une diminution significative du taux de la fraction B2 obtenu sur les plasma traités, Ceci semble être cohérent avec les résultats d'Henrik Zetterberget al [89]. Néanmoins, Les taux de cette fraction obtenus sur les plasma traités, ne montrent pas une bonne corrélation avec ceux obtenus sur sérum.

La dilution utilisée pour la précipitation du fibrinogène est  $1/10^{\text{ème}}$  (100  $\mu$ l d'éthanol absolu + 900 $\mu$ l du plasma). Cette dilution semble être optimale pour précipiter le fibrinogène, et de ne pas affecter le taux des fractions électrophorétiques [90]. Ceci est démontré dans notre étude, du moment que les taux des fractions électrophorétiques obtenus sur plasma traité montrent une bonne corrélation avec ceux obtenus sur sérum, à l'exception de la fraction B2.

## DISCUSSION

---

De ce fait, le tube sec reste le prélèvement de choix pour effectuer les électrophorèses des protéines sanguines, car il permet d'éviter l'interférence du fibrinogène.

Cependant, dans certaines situations, on peut être confronté à cette interférence, qui peut prendre l'aspect d'une augmentation du taux de la fraction B2 (Anomalie mise en évidence dans cette étude), ou encore, engendrer des déformations d'allures monoclonales [91].

Dans ces situations il paraît raisonnable, de procéder au traitement du sérum par de l'éthanol absolu, avant de procéder à un immunotypage, ou de demander un autre prélèvement.

Parmi les différentes interférences analytiques rencontrées en électrophorèse des protéines sériques, l'interférence de la bilirubine semble être la moins documentée.

Pour l'étude de cette interférence, nous avons procédé au recueil d'échantillons sanguins provenant de patients ictériques. Et vu la difficulté rencontrée au recueil de sérum, notre étude s'est basée sur l'analyse de plasma ictériques.

Le taux de bilirubine moyen de ces échantillons est de l'ordre de 84.14 mg/l en bilirubine totale, et de 36.63 mg/l en bilirubine directe.

Après photodégradation, la concentration en bilirubine a significativement diminuée. Et nous avons comparé les profils électrophorétiques obtenus des échantillons, avant et après photo dégradation. Les résultats de cette comparaison n'ont montré aucune différence chez 79.4% de nos échantillons. Par ailleurs, chez 7 échantillons (20.5%), une anomalie est constatée sous forme d'une fraction supplémentaire en pré ou en post albumine avant photo dégradation, et dont le taux moyen est estimé à 4.6%. Cependant ce taux a significativement diminué après photo dégradation (2.31%), et la fraction supplémentaire a disparue sur la majorité des échantillons.

Ces résultats confirment ceux obtenus par Ilhem Hellara et al qui ont rapporté que la bilirubine interfère essentiellement avec la fraction albumine. En effet, la bilirubine circule dans le sang sous une forme libre (Bilirubine indirecte), et sous une forme conjuguée (Bilirubine directe). Cette dernière serait à l'origine de l'apparition de cette fraction supplémentaire ou bien à l'étalement de la fraction albumine, selon les résultats de cette étude [92]. La bilirubine libre ne serait pas donc responsable de cette interférence. Ceci est constaté dans notre série au niveau de 4 échantillons ayant un des taux élevés en bilirubine libre (103 mg/l pour 106 mg/l de bilirubine totale, 174 mg/l pour 180 mg/l de bilirubine totale, 96 mg/l pour 106 mg/l de bilirubine totale, et 103 mg/l pour 107 mg/l de bilirubine totale) respectivement. L'analyse des tracés électrophorétiques obtenus de ces échantillons n'a pas mis en évidence des anomalies.

## **DISCUSSION**

---

De ce fait on peut dire que bien que la bilirubine interfère en électrophorèse des protéines sériques, Cette interférence semble être minime et n'influence pas l'interprétation des profils électrophorétiques.

# **CONCLUSION ET RECOMMANDATION**

## Conclusion et Recommandations

---

L'électrophorèse des protéines sériques, comme toute technique de laboratoire peut être influencée par des interférences analytiques.

Dans notre étude, nous avons analysé l'impact de l'hémolyse, du fibrinogène et de la bilirubine sur cette technique :

- L'hémolyse interfère avec les fractions alpha 2 et Béta 1 du tracé électrophorétique.
- La présence du fibrinogène est à l'origine d'une élévation de la fraction Béta 2.
- Et la bilirubine influence la fraction albumine, avec apparition d'une fraction supplémentaire en pré et en post albumine.

Le tube sec reste le prélèvement de choix pour la réalisation des EPP, car il permet d'éviter l'interférence en fibrinogène. Cette interférence peut être constatée même sur sérum ; Dans cette situation le traitement de l'échantillon par l'éthanol absolu prend toute sa place.

L'étape pré analytique est très importante pour la préparation des échantillons sériques de bonne qualité, en évitant l'hémolyse qui survient souvent en cette étape. Il est donc important d'insister sur la qualité du prélèvement (Eviter la pause prolongée du garrot...), agitation non excessive du tube, et une centrifugation adéquate.

L'interférence de la bilirubine semble être minime, et n'a pas d'impact sur l'interprétation des profils électrophorétiques.

Il convient enfin d'insister, lors de l'interprétation des profils électrophorétiques d'instaurer une étape d'analyse de la qualité du sérum (Ictérique, hémolysé,...), ce qui permet d'expliquer certaines anomalies sur les tracés pouvant être liées à ces interférences, en combinaison avec le résumé du contexte clinique de la demande qui doit impérativement accompagner toute demande d'électrophorèse des protéines sériques.

## Références bibliographiques

1. S.F.Y.Li Capillary Electrophoresis, Volume 52 1st Edition Principles, Practice and Applications Authors.
2. Ph.Casier.Association française des ingénieurs biomédicaux : panorama des automates de laboratoire ITBM-RBM News. 2004.
3. TrivinF., T. et al. Nouvelles techniques d'électrophorèse application aux protéines et à l'ADN. Immuno-analyse et biologie spécialisée 2003.
4. Le Carrer D. Electrophorèse des protéines sériques (Sebia).
5. VeutheyJ.L. et al. Electrophorèse capillaire : historique et perspective. LabChim Anal Pharm. Université de Genève 2005.
6. F. Trivin, T. Le Bricon / Immuno-analyse & Biologie spécialisée 18 .2003.
7. PELTRE G,. Electrophorèse, les trois principes de base. Technique et biologie, 1990
8. Magniez frédéric.L'électrophorèsePublié dans #biotechnologies 2008.
9. Aude barani .les méthodes d'électrophorèse: l'essentiel février 2007.
10. B.Lissoir, P.Wallemacq et D.Maisin.l'électrophorèse en gel d'agarose Hydrasys ® (Sebia). Annales de biologie clinique. 2003.
11. Blessum c.et al : l'électrophorèse capillaire : principe et applications au laboratoire de biologie clinique. Ann biol clin 1999.
12. 41-Maréchal V. Electrophorèse capillaire. Encyclopédie Médico- Chirurgicale, Biologie clinique, Elsevier Masson SAS, 2007.
13. Quand prescrire une électrophorèse des protéines sériques (EPS) et conduite à tenir en cas d'une immunoglobuline monoclonale fiche memo Janvier 2017.
14. jeff. 2013, journal des femmes Santé sémiologie médicale – définition proteines seriques .
15. FéraudG, et al. Place de la Transthyrétine en biologie Clinique. Ann Biol Clin 2003;
16. Dorée D. Biochimie clinique. Pages 399 ; 400 ; 401 ; 403 ; 410 ; 411 ; 412.
17. Kanda Y. et al. The aminocid séquence of human plasma préalbumin. J BiolChem 1974; 249: 6795-6805.
18. BoulmalN. Evaluation de l'état nutritionnel des malades en réanimation : Thèse de Pharmacie N°43/2009 Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat.
19. Dall'OstoH. et al. Nutrition parentérale: indications, modalités et complications EMC (Elsevier SAS, Paris) Gastro-entérologie.

20. Bach-Ngohou, et al. Les dysalbuminémies. Ann Biol Clin 2005.
21. Brennan SO, et al. Three truncated forms of serum albumin associated with pancreatic pseudocyst. Biochim Biophys Acta 2000.
22. Valdigué P. Protéines plasmatiques.
23. Alexandre JA. Les marqueurs biologiques de la dénutrition: place des profils nutritionnels. XXXI<sup>ème</sup> colloque national des biologistes des hôpitaux. Spectra Biol 2003.
24. K. Bach-Ngohou revue générale abc Ann Biol Clin 2004, 62 : 395-403 Ann Biol Clin, vol. 62, n° 4, juillet-août 2004.
25. K Bach-Ngohou et al. Les dysalbuminémies Volume 63, numéro 2, Mars-Avril 2005.
26. A Szymanowicz, B Cartier, et al Proposition de commentaires interprétatifs prêts à l'emploi pour l'électrophorèse des protéines sériques. Ann Biol Clin 2006.
27. M. Steinbuch. Rapport du VIII<sup>e</sup> Congrès National de Transfusion Sanguine : Les antiprotéases du plasma. Rev Fr de transfusion 1971.
28. RF. Ritchie et al. reference destination for the positive acute phase serum proteins alpha-1-acide glycoproteins (orosmocoide) alpha anti trypsin and haptoglobine. s.l. : J clin lab ana, 2000.
29. les protéines plasmatiques DCEM 1 département de biochimie et biologie moléculaire année universitaire 2006-2007.
30. Biomnis orosomucoide. 2013.
31. Ferrarotti M, Thun JA, Zorzetto M, Ottaviani S, Imboden M, Schindler C, et al. Serum levels and genotype distribution of  $\alpha$ 1-antitrypsin in the general population. Thorax. 2012; Didier Le Carrer, Kalyane Bach-Ngohou.
32. Biomnis ,biologie médicale spécialisé alpha-2-macroglobuline 2014.
33. Haptoglobine, biomnis 2012, Précis de biopathologie analyses médicales spécialisées
34. Bovin P. et al. L'anémie des cirrhoses, fréquences et mécanismes. Nouv Rev Fr Hematol 1961.
35. Dubucquois et all, interprétations des examens biologiques au cours de la grossesse. Rev Rhum 2005.
36. D. Pérez Surribas, M.C. Cárdenas Fernández, E. Zapico Muñoz, Recomendaciones sobre la separación electroforética de las proteínas plasmáticas en el suero Recomendación (2014).

37. Boissier F. Etude de l'expression du gène de la transferrine humaine. Thèse de Doctorat : sciences biologiques Fondamentales et appliquées, psychologie : Université Paris VI ; Paul R. Cohen. (Directeur de thèse). Année : 1990.
38. Cynober L. et al. Exploration biologique du statut nutritionnel. Nutrition Clinique et métabolisme 2004.
39. Melchior J.-C. Evaluation de l'état nutritionnel. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) Endocrinologie-Nutrition, 2009.
40. R. Durant et al. inflammatory syndrome in elderly people. 2005. pp. 284-290.
41. N. Collet. Cours de l'exploitation biochimique des protéines. s.l., CHU de Rennes : laboratoire de biochimie, Novembre 2008.
42. Support de Cours, Item 126 : Immunoglobuline monoclonale COFER, Collège Français des Enseignants en Rhumatologie.
43. J. Marchall et K. Bangert. biochimie médicale. 2005.
44. Pr. Guiraud. Biochimie clinique, Nutrition, Métabolisme
45. A. Regeniter, W. Siede Peaks and tails: Evaluation of irregularities in capillary serum proteinelectrophoresis
46. profils inflammatoire, memobio: [http://www.memobio.fr/html/immu/im\\_in\\_pip.html](http://www.memobio.fr/html/immu/im_in_pip.html).
47. Dr Caroline THOMAS décembre 2015 Interprétation de l'électrophorèse des protéines sériques.
48. cirrhose décompensé, memobio : [http://www.memobio.fr/html/bioc/bi\\_he\\_ci.html](http://www.memobio.fr/html/bioc/bi_he_ci.html).
49. I. Jahn\*, G. Diez, J. Goetz, Contribution of capillary zone electrophoresis and serum free light chain immunoassays in the exploration of immunoglobulins: Immunologist point of view
50. Jay DW, Provasek D. Characterization and mathematical correction of hemolysis interference in selected Hitachi 717 assays. *ClinChem* 1993
51. Fremont S, Combe AM, Mecrin M, *et al.* Influence des interférences visibles sur les dosages de biochimie réalisés sur AU 5231, AU 5223 (Olympus) et CL 7200.
52. 46-Prof. Dr. L. Thomas, Kirschbaumweg 8, 60489 Frankfurt Deutschl and Haemolysis as influence & interference factor
53. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and serum samples. World Health Organization 2002
54. Orientation diagnostique devant une anémie 01/02/2010

55. Kroll MH, Elin RJ. Interference with clinical laboratory analyses. *Clin Chem.* 1994; 40(11 Pt1):1996–2005.
56. Jay DW, Provasek D. Characterization and mathematical correction of hemolysis interference in selected Hitachi 717 assays. *ClinChem* 1993
57. Damien L, Hemolysis influence on twenty-two biochemical parameters measurement
58. Ji ZJ, Meng QH. Evaluation of the interference of haemoglobin, bilirubine and lipid interference on Roche Cobas 6000 assays. *ClinChimActa* 2011
59. Thomas L. Haemolysis as influence and interference factor. *BiochimClin.* 2002;
60. Benlakehal M, Le Bricon T, Feugeas JP et al. Influence de l'hémolyse sur le dosage et l'électrophorèse des protéines sériques. *Ann Biol Clin*20005.
61. Samama, M.M., Emile, Cahier de formation biologiemedicale – Hemostase et thrombose 2000.
62. Javorschi, S. et al.: Relative influence of age and thrombotic history on hemostatic parameters. *Thromb. Res.*, 91 (5), 1998,
63. Colas, L.: Fibrinogene : nouveau facteur de risque cardiovasculaire. *Act. Med.Int. - Hypertension.* 2000.
64. J.A. Snyder, M.S. Willis, D.G. Grenache, Immunofixation reveals an apparent  $\alpha$  heavy chain caused by precipitation of fibrinogen with IgA antiserum, *Clin. Chim.Acta* 368 (2006) 192–194, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2005.12.032>.
65. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and serum samples. World Health Organization 2002
66. Professeur MICHEL.CHARREL, sémiologie biochimique
67. ALAIN FIACRE, ALAIN BACQUE-BELAI, NICOLE BLACQUE-BELAI, examen biologique clinique, 4<sup>eme</sup> édition maloine 2011
68. ROSE-MARIE HAMLADJI, précis de sémiologie ,13<sup>eme</sup> édition
69. LAUGIER J., ROZE JC., SIMEONI U. ; Soins aux nouveau-nés avant, pendant et après la naissance 2<sup>eme</sup> éd. ; Paris : Masson, 2006, 839p ; p 491-506
70. HERVE DURAND, PHILIPPE BICLET, dictionnaire des examens biologiques et investigation paraclinique,3<sup>eme</sup> edition doin ,octobre1991
71. VERT P., ARTHUIS M. Rapport de l'Académie Nationale de médecine. La première semaine de vie, 31.mai.2005
72. STRACZEK H., VIEUX R. Sorties précoces de maternité : quels problèmes anticiper *Archives de Pédiatrie*, 2008, Vol 15, 1076-1082

73. CORTEY A. Ictères et hyperbilirubinémies du nouveau-né.[En ligne] CNRHP. Mars 2011. [Référence du 15 janvier 2013] 213.218.138.82/www.3cfr.fhpmco.fr/dragon-media/8mars 2011Icteres et hyperbilirubinémies du nouveau ne.pdf
74. -Bienvenu J, Graziani MS, Arpin F et al. Multicenter evaluation of the paragon CZE 2000™ capillary zone electrophoresis system for serum protein electrophoresis and monoclonal component typing.ClinChem 1998.
75. Hellara I, Fekih O, Triki S et al. La bilirubine interfère-t-elle sur l'électrophorèse capillaire des protéines sériques ?Ann BiolClin 2014;
76. Colette Chapuis Celli et al, L'électrophorèse des protéines sériques en biologie médicale : interférences et facteurs confondants 2018.
77. L.J. Kricka, Human anti-animal antibody interferences in immunological assays,
78. I.V. Kaplan, S.S. Levinson, When is a heterophile antibody not a heterophile antibody When it is an antibody against a specific immunogen, Clin. Chem. 45 (1999)
79. M.L. Arranz-Peña, M. González-Sagrado, A.M. Olmos-Linares, N. Fernández-García, F.J. Martín-Gil, Interference of iodinated contrast media in serum capillary zone electrophoresis, Clin. Chem. 46 (2000) 736–737
80. Bossuyt, A. Mewis, N. Blanckaert, Interference of radio-opaque agents in clinical capillary zone electrophoresis, Clin. Chem. 45 (1999).
81. Bossuyt X, Peetermans W. Effect of piperacillin-tazobactam on clinical capillary zone electrophoresis of serum proteins.ClinChem 2002.
82. Bossuyt X, Verhaegen J, Mariën G et al. Effect of sulfamethoxazole on clinical capillary zone electrophoresis of serum proteins.ClinChem
83. H. Caillon, F. Fraissinet, M.G. Denis, T. Dejoie, Identification of 5-fluorocytosine as a new interfering compound in serum capillary zone electrophoresis, Clin.Chem. Lab. Med. 55 (2017)
84. Gay-Bellile C, Bengoufa D, Houze P et al. Automated multicapillary electrophoresis for analysis of human serum proteins.ClinChem 2003;
85. K. Gijbels, J. De Coster, X. Bossuyt, Interference by gelatin-based plasma substitutes in capillary zone electrophoresis, Clin.Chem. 50 (2004).
86. Institute Pasteur D'Algérie, service d'immunologie, unité d'immunochimie technique de précipitation par l'éthanol
87. Gay-Bellile C, Bengoufa D, Houze P, Le Carrer D, Benlakelal M, Bousquet B, Gourmel B, Le Bricon T. Automated Multicapillary Electrophoresis For Analysis Of Human Serum Proteins. ClinChem, 2003, 49, 1909-1915.

88. Benkahel et all. Influence de l'hémolyse sur le dosage et l'électrophorèse des protéines sériques.
89. Henrik Zetterberg, Herman Nilsson-Ehle . Ethanol Precipitation Is Not Reliable for Selectively Removing Nonmonoclonal Peaks Seen in the Fibrinogen Region on Capillary Zone Electrophoresis of Serum Proteins
90. Ling L et all . Convenient and Effective Method for Removing Fibrinogen from Serum Specimens before Protein Electrophoresis.
91. L. Lefèvre . Présence résiduelle de fibrinogène : un piège fréquent dans l'interprétation de l'électrophorèse des protéines sériques Hellara I, Fekih O, Triki S, Elmay A, Neffati
92. F, Najjar MF. La bilirubine interfère-t-elle sur l'électrophorèse capillaire des protéines sériques ? Ann Biol Clin 2014 ; 72(1) : 124-8 doi:10.1684/abc.2013.0926.

# ANNEXES





## Annexe IV: Fiche technique du CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 Sebia. (Ref. 2003)

CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 - 2017/04

### UTILISATION

Le kit CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 permet la séparation en milieu basique (pH 9,9) des protéines du sérum humain et de l'urine par électrophorèse capillaire dans le système automatique CAPILLARYS.

Les protéines du sérum normal humain sont séparées en six fractions majeures.

Les protéines urinaires sont séparées en cinq zones, après préparation des échantillons d'urine à l'aide du kit CAPILLARYS / MINICAP URINE (Voir la notice d'utilisation du kit CAPILLARYS / MINICAP URINE, SEBIA, référence 2013).

Le système CAPILLARYS permet de réaliser toutes les séquences de l'électrophorèse jusqu'à l'obtention du profil protéique pour l'analyse qualitative ou quantitative. Les protéines, séparées dans des capillaires en silice fondue, sont détectées directement au niveau d'une cellule sur le capillaire par spectrophotométrie d'absorbance à 200 nm. Les profils électrophorétiques sont analysés visuellement pour détecter les anomalies. La détection directe donne automatiquement une quantification relative précise de chaque fraction.

À usage *in vitro* exclusivement.

**NOTE :** Dans cette notice d'utilisation, le nom "CAPILLARYS" est utilisé pour désigner les systèmes automatiques CAPILLARYS, CAPILLARYS 2 et CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING, SEBIA.

### PRINCIPE DU TEST

L'électrophorèse des protéines du sérum humain est une analyse très utile en laboratoire d'analyses cliniques pour rechercher les modifications du profil protéique. Parallèlement aux techniques d'électrophorèse sur différents supports, dont le gel d'agarose, la technique d'électrophorèse capillaire s'est développée car elle offre l'avantage d'une automatisation complète de l'analyse, de séparations rapides et d'une bonne résolution. Elle se définit comme une technique de séparation électrocinétique effectuée dans un tube de diamètre interne inférieur à 100 µm rempli d'un tampon composé d'électrolytes. Par de nombreux aspects, elle se présente comme un intermédiaire entre l'électrophorèse classique de zone sur support et la chromatographie liquide.

Le système CAPILLARYS utilise le principe de l'électrophorèse capillaire en solution libre, qui représente la forme la plus courante de l'électrophorèse capillaire. Il permet la séparation de molécules chargées en fonction de leur mobilité électrophorétique propre dans un tampon de pH donné, et, selon le pH de l'électrolyte, d'un flux électro-osmotique plus ou moins important. Le système CAPILLARYS comprend 8 capillaires en parallèle, permettant 8 analyses simultanées. Sur ce système, l'injection dans les capillaires de l'échantillon (dilué dans le tampon d'analyse) est effectuée à l'anode par aspiration. La séparation est ensuite réalisée en appliquant une différence de potentiel de plusieurs milliers de volts aux bornes de chaque capillaire. La détection directe des protéines est effectuée à 200 nm côté cathode. Les capillaires sont ensuite lavés par une solution de lavage, puis par le tampon d'analyse. Avec le tampon utilisé à pH basique, l'ordre de migration des protéines sériques est le suivant : gamma globulines, bêta-2 globulines, bêta-1 globulines, alpha-2 globulines, alpha-1 globulines et albumine. Chaque fraction contient un ou plusieurs constituants sériques.

### RÉACTIFS FOURNIS DANS LES KITS CAPILLARYS PROTEIN(E) 6

**ATTENTION :** Voir les fiches de données de sécurité.

COMPOSANTS	RÉF. N° 2003
Tampon (prêt à l'emploi)	2 flacons de 700 mL
Solution de lavage (solution concentrée)	1 flacon de 75 mL
Barrettes de dilution	1 sachet de 90
Filtres	3 filtres

**POUR UNE GESTION OPTIMALE DE LA TRAÇABILITÉ :** Les éléments d'un même kit doivent être utilisés ensemble.

**POUR L'OBTENTION DES PERFORMANCES ATTENDUES :** Les instructions de la notice doivent être respectées.

**ATTENTION :** Ne pas utiliser d'eau déminéralisée du commerce, eau pour fer à repasser par exemple (risque de détérioration importante des capillaires). Utiliser exclusivement de l'eau de qualité ultrapure, type eau pour préparation injectable.

#### 1. TAMPON

##### Préparation

Le tampon est prêt à l'emploi. Il contient : tampon pH 9,9 ± 0,5 ; composants sans danger aux concentrations utilisées nécessaires pour des performances optimales.

##### Utilisation

Tampon pour l'analyse des protéines sériques en électrophorèse capillaire.

##### Conservation, stabilité et signes de détérioration

Le tampon doit être conservé à température ambiante (de 15 à 30 °C) ou au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C). Il est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le kit ou sur l'étiquette du flacon de tampon. Ne pas stocker le tampon à proximité d'une fenêtre ou d'une source de chaleur.

**NOTE :** Si le tampon d'analyse a été conservé à 2 – 8 °C, il convient de le laisser atteindre la température ambiante avant toute utilisation.

##### NE PAS CONGELER.

Un flacon de tampon entamé, installé sur l'instrument CAPILLARYS, est stable au maximum 2 mois (cumulés). En cas d'utilisation d'un flacon de tampon dans un délai prévisionnel supérieur à 2 mois, il doit être retiré de l'instrument après chaque utilisation et être conservé à température ambiante (de 15 à 30 °C) ou au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C), il est alors stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette du flacon de tampon. Éliminer le tampon s'il y a un changement d'aspect ou apparition d'un trouble dû à une contamination microbienne, d'un précipité ou de particules en suspension.

## 2. SOLUTION DE LAVAGE

### Préparation

Le flacon de solution de lavage concentrée doit être complété à 750 mL avec de l'eau distillée ou déminéralisée.  
Après dilution, la solution de lavage contient une solution basique pH = 12.

### Utilisation

Pour le lavage des capillaires après séparation électrophorétique des protéines.

**IMPORTANT** : Avant de remplir le flacon de solution de lavage, il est recommandé de rincer abondamment à l'eau distillée ou déminéralisée le col du flacon, le connecteur et le tuyau afin d'éviter l'accumulation de sels.

### Conservation, stabilité et signes de détérioration

Les solutions de lavage concentrée et diluée doivent être conservées à température ambiante (de 15 à 30 °C) ou au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C) en flacons fermés pour éviter l'évaporation. La solution concentrée est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le kit ou sur l'étiquette du flacon de solution de lavage.

La solution diluée est stable pendant 3 mois.

Éliminer la solution de lavage diluée s'il y a un changement d'aspect ou apparition d'un trouble dû à une contamination microbienne.

## 3. BARRETTES DE DILUTION

### Utilisation

Barrettes de dilution à usage unique pour la préparation des échantillons biologiques à analyser par l'automate. À placer sur le portoir. Une barrette de dilution est destinée à l'analyse de 8 échantillons (7 échantillons en présence d'un diluant).

**ATTENTION** : Après utilisation, manipuler avec précaution les barrettes de dilution contenant des échantillons biologiques. Une fois l'analyse terminée, les barrettes de dilution doivent être éliminées avec les déchets biologiques et ne doivent JAMAIS être réutilisées.

### Conservation

Avant utilisation, les barrettes de dilution doivent être conservées dans leur emballage hermétiquement clos dans un endroit propre et sec et à une température comprise entre 2 °C et 30 °C.

## 4. FILTRES

### Utilisation

Filtres à usage unique pour la filtration du tampon, de la solution de lavage reconstituée et de l'eau distillée ou déminéralisée (utilisée pour le rinçage des capillaires).

**IMPORTANT** : Remplacer systématiquement les filtres à chaque renouvellement de kit. Porter des gants propres pour la manipulation et l'installation des filtres.

Visser un filtre sur chaque embout de tuyau plongeant dans les flacons de tampon, de solution de lavage et d'eau distillée ou déminéralisée. Lors de la mise en place des filtres sur l'appareil, rincer les connecteurs et les tuyaux à l'eau distillée ou déminéralisée.

### Conservation

Avant utilisation, les filtres doivent être conservés dans leur emballage hermétiquement clos dans un endroit sec et à température ambiante (de 15 à 30 °C) ou au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C).

## RÉACTIFS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

**ATTENTION** : Voir les fiches de données de sécurité.

### 1. EAU DISTILLÉE OU DÉMINÉRALISÉE

#### Utilisation

Pour le rinçage des capillaires de l'automate pour électrophorèse capillaire, CAPILLARYS, SEBIA.

Il est recommandé d'utiliser de l'eau distillée ou déminéralisée filtrée (sur filtre de porosité  $\leq 0,45 \mu\text{m}$ ) et d'une conductivité inférieure à  $3 \mu\text{S/cm}$ , soit une résistivité supérieure à  $0,33 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ .

Afin d'éviter les contaminations microbiennes, renouveler l'eau chaque jour.

Pour un fonctionnement optimum, il est recommandé d'ajouter du CLEAN PROTECT (SEBIA, référence N° 2059 : 1 flacon de 5 mL) à l'eau distillée ou déminéralisée (voir la notice d'utilisation du CLEAN PROTECT) ou d'utiliser directement la solution CAP|protect\* prête à l'emploi (SEBIA, référence N° 2061 : 2 bidons de 5 L d'eau distillée avec CLEAN PROTECT).

**IMPORTANT** : Avant de remplir le flacon de rinçage, il est recommandé de le rincer abondamment avec de l'eau déminéralisée ou distillée.

\* NOTE : La solution CAP|protect peut aussi être utilisée pour diluer la solution de lavage concentrée. Dans ce cas, la solution de lavage diluée peut alors présenter une coloration transitoire jaune plus ou moins prononcée sans que cela n'affecte les performances du test.

### 2. CAPICLEAN

#### Présentation

Le flacon de solution enzymatique concentrée CAPICLEAN (SEBIA, référence N° 2058 : 1 flacon de 25 mL) contient : enzymes protéolytiques, surfactants et composants sans danger aux concentrations utilisées, nécessaires pour des performances optimales.

#### Utilisation

Pour le nettoyage de l'aiguille de prélèvement de l'automate pour électrophorèse capillaire, CAPILLARYS, SEBIA, au cours du cycle de nettoyage CAPICLEAN.

#### IMPORTANT :

- Quand moins de 500 analyses sont réalisées par semaine, réaliser un cycle de nettoyage avec CAPICLEAN au minimum une fois par semaine.
- Quand moins de 500 analyses sont réalisées par jour et plus de 500 analyses sont réalisées par semaine, réaliser un cycle de nettoyage avec CAPICLEAN toutes les 500 analyses.
- Quand plus de 500 analyses sont réalisées par jour, réaliser un cycle de nettoyage avec CAPICLEAN une fois par jour.

Voir la notice d'utilisation de CAPICLEAN, SEBIA.

**IMPORTANT** : Après le nettoyage de l'aiguille de prélèvement, ne pas réutiliser la barrette de dilution.

**Conservation, stabilité et signes de détérioration**

CAPICLEAN doit être conservé au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C). Il est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette du flacon. NE PAS CONGELER.

Un précipité ou des particules agrégées en suspension (floculat) peuvent être observés dans le flacon de CAPICLEAN sans que cela n'affecte son utilisation.

Ne pas remettre en suspension ce précipité ou ces particules. Il est recommandé de ne prélever que le surnageant.

**3. SOLUTION D'HYPOCHLORITE DE SODIUM (pour le nettoyage de l'aiguille de prélèvement)****Préparation**

Préparer une solution d'hypochlorite de sodium (eau de Javel) à 2 - 3 % de chlore à partir d'une dose concentrée de 250 mL à 9,6 % de chlore diluée à 1 litre (volume final) dans de l'eau froide distillée ou déminéralisée.

**Utilisation**

Pour le nettoyage de l'aiguille de prélèvement de l'automate pour électrophorèse capillaire, CAPILLARYS, SEBIA (entretien hebdomadaire afin d'éliminer toute protéine adsorbée sur l'aiguille).

Voir la notice d'utilisation de CAPILLARYS, SEBIA.

- Utiliser le portoir spécifique de maintenance (n° 100).
- Placer sur ce portoir, en position 1, un tube à hémolyse contenant 2 mL de solution d'hypochlorite de sodium préparée précédemment.
- Introduire le portoir n° 100 de maintenance dans le système CAPILLARYS.
- Dans le menu de la fenêtre "MAINTENANCE" apparaissant à l'écran, sélectionner "Lancer le nettoyage aiguille (solution d'hypochlorite de sodium)", puis valider.

**Conservation, stabilité et signes de détérioration**

La solution d'hypochlorite de sodium diluée peut être conservée 3 mois à température ambiante (de 15 à 30 °C) dans un récipient en plastique fermé hermétiquement, à l'abri des rayonnements solaires et de toute source de chaleur ou d'ignition et à l'écart des acides et de l'ammoniaque.

**4. SOLUTION DE LAVAGE CAPILLARYS / MINICAP****Préparation**

Chaque flacon de solution de lavage concentrée (SEBIA, référence N° 2052 : 2 flacons de 75 mL) doit être complété à 750 mL avec de l'eau distillée ou déminéralisée.

Après dilution, la solution de lavage contient une solution basique pH = 12.

**Utilisation**

Pour le lavage des capillaires de CAPILLARYS. Réactif additionnel nécessaire dans le cas de séries inférieures à 40 analyses.

**IMPORTANT** : Avant de remplir le flacon de solution de lavage, il est recommandé de rincer abondamment à l'eau distillée ou déminéralisée le col du flacon, le connecteur et le tuyau afin d'éviter l'accumulation de sels.

**Conservation, stabilité et signes de détérioration**

Les solutions de lavage concentrée et diluée doivent être conservées à température ambiante (de 15 à 30 °C) ou au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C) en flacons fermés pour éviter l'évaporation. La solution concentrée est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le kit ou sur l'étiquette du flacon.

La solution diluée est stable pendant 3 mois.

Éliminer la solution de lavage diluée s'il y a un changement d'aspect ou apparition d'un trouble dû à une contamination microbienne.

**NOTES :**

*Les tests réalisés lors de la validation des réactifs montrent que, pour les différentes solutions et avec l'utilisation d'un matériel adapté au volume à reconstituer, une variation du volume final de ± 5 % n'affecte en rien la qualité de l'analyse.*

*L'eau distillée ou déminéralisée, utilisée pour la reconstitution des solutions, doit être exempte de colonies bactériennes et de moisissures (utiliser un filtre de porosité ≤ 0,45 µm) et d'une conductivité inférieure à 3 µS/cm, soit une résistivité supérieure à 0,33 MΩ.cm.*

**ÉQUIPEMENT ET ACCESSOIRES NÉCESSAIRES**

1. Système d'électrophorèse capillaire CAPILLARYS SEBIA : CAPILLARYS référence N° 1220, CAPILLARYS 2 référence N° 1222 ou CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING référence N° 1227.
2. Portoirs, fournis avec le système CAPILLARYS.
3. Bidons plastiques fournis avec le système CAPILLARYS : flacon pour le rinçage des capillaires (à remplir avec de l'eau déminéralisée ou distillée), flacon de solution de lavage et flacon de vidange.

**ÉCHANTILLONS À ANALYSER****ANALYSE DES SÉRUMS****Prélèvement et conservation des échantillons**

L'analyse se fait sur sérums frais. Les sérums doivent être prélevés selon la procédure utilisée pour tout test de laboratoire d'analyses cliniques.

Les échantillons peuvent être conservés au maximum 10 jours au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C).

Pour des conservations prolongées, congeler rapidement les échantillons à -18 / -30 °C (au maximum dans les 8 heures après le prélèvement).

Les sérums congelés sont stables 2 mois.

Les protéines des échantillons conservés entre 2 et 8 °C ou entre 15 et 30 °C, se dégradent, en particulier le complément C3 pour lequel la cinétique de dégradation est très rapide à 15 - 30 °C et est nettement visible au-delà de 3 jours.

Un sérum conservé entre 2 et 8 °C ou entre 15 et 30 °C présente une fraction bêta-2 qui diminue progressivement et peut apparaître déformée (avec apparition de petits pics supplémentaires du côté gamma et / ou bêta-1 suite à la dégradation du complément C3) et une fraction alpha-2 dont la forme peut être légèrement modifiée.

Au-delà de 10 jours entre 2 et 8 °C ou 3 jours entre 15 et 30 °C, la fraction bêta-1 se déforme en s'élargissant, et la fraction bêta-2 diminue fortement. Selon les échantillons, lors de leur conservation au-delà de 10 jours entre 2 et 8 °C ou 3 jours entre 15 et 30 °C, l'intégration automatique des fractions par le logiciel de traitement des données peut potentiellement être perturbée.

**NOTE :** *Chaque laboratoire doit s'assurer que les échantillons sont transportés dans les conditions optimales pour leur intégrité (1).*

(1) ISO 15189 : Laboratoires de biologie médicale - Exigences concernant la qualité et la compétence.

### Préparation des échantillons

Utiliser directement les échantillons de sérum non dilués.

Après conservation au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C) ou congélation, certains sérums (en particulier ceux qui contiennent une cryoglobuline ou un cryogel) deviennent visqueux ou troubles. Après remise à l'état liquide, ces sérums peuvent être analysés directement.

De même, les sérums contenant une immunoglobuline polymérisée peuvent être utilisés directement, sans traitement préalable.

Il est recommandé d'observer l'aspect du sérum avant l'analyse (cas d'hémolyse, de présence de cryoglobulines ou de turbidité).

### Échantillons à éviter

- Éviter les échantillons de sérum hémolysés. L'hémolyse peut entraîner un dédoublement de la fraction alpha-2.
- Ne pas utiliser des échantillons de sérum anciens ou conservés dans de mauvaises conditions, les fractions bêta seraient fortement modifiées.
- Ne pas utiliser de plasma. Le fibrinogène migre en position bêta-2 (pic épaulé en bêta-2 ou confondu avec la fraction bêta-2 avec éventuellement augmentation du pourcentage de cette fraction). Sa présence dans certains échantillons (cas de plasma, de sérum mal défibriné ou de patient sous traitement anticoagulant) peut fausser l'interprétation de l'analyse (confusion avec une bande monoclonale migrant en position bêta-2 ou augmentation du pourcentage de cette fraction). Dans le cas de l'analyse (non recommandée) d'un échantillon de plasma ancien, le complément C3 qui est labile au cours du temps, est partiellement dégradé et la fraction bêta-2 correspond alors essentiellement à du fibrinogène.

### ANALYSE DES URINES

Voir la notice d'utilisation du kit CAPILLARYS / MINICAP URINE, SEBIA, référence 2013.

**NOTE :** *Les tubes de prélèvement des échantillons biologiques sont décrits dans la documentation disponible sur la phase pré-analytique de biologie médicale (données fournies par les fabricants de tubes, guides et recommandations sur le prélèvement biologique...). En l'absence d'indication dans la notice d'utilisation sur le type de tube à utiliser, se référer à cette documentation et pour les dimensions de tube à utiliser, se référer au document SEBIA "Caractéristiques des tubes à utiliser selon l'instrument". La phase pré-analytique doit être réalisée selon l'état de l'art, les différentes recommandations, dont celles fournies par les fabricants de tubes, et la réglementation applicable.*

### TECHNIQUE

Le système CAPILLARYS est un instrument multiparamétrique automatique qui assure l'analyse des protéines sériques sur 8 capillaires en parallèle selon les étapes suivantes :

- lecture des codes-barres des tubes primaires (jusqu'à 8) et du portoir ;
- dilution des échantillons à partir des tubes primaires ;
- lavage des capillaires ;
- injection des échantillons dilués ;
- séparation et détection directe des protéines sur les capillaires.

Les étapes manuelles sont les suivantes :

- mise en place des tubes primaires dans les portoirs ;
- introduction dans le système CAPILLARYS ;
- récupération des portoirs après analyse.

LIRE ATTENTIVEMENT LE MANUEL D'INSTRUCTIONS DE CAPILLARYS.

#### I. PRÉPARATION DE L'ANALYSE ÉLECTROPHORÉTIQUE

1. Mettre CAPILLARYS et l'ordinateur de contrôle sous tension.
2. Démarrer le logiciel, l'automate est alors automatiquement initialisé.
3. Utiliser le kit CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 avec le programme d'analyses "PROTEIN(E) 6". Pour sélectionner le programme d'analyses "PROTEIN(E) 6" et mettre en place le flacon de tampon CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 sur l'appareil, lire attentivement le manuel d'instructions de CAPILLARYS.
4. Le portoir possède 8 emplacements pour tubes. Placer jusqu'à 8 tubes primaires sur chaque portoir, en prenant bien soin de laisser le code-barres de chaque tube en face de sa fenêtre de lecture.  
**IMPORTANT :** Si le nombre de tubes à analyser est inférieur à 8, compléter le portoir par des tubes contenant de l'eau distillée ou déminéralisée.
5. Placer une barrette de dilution neuve sur chaque portoir. En cas d'absence de barrette, le portoir est éjecté.
6. Introduire le (ou les) portoir(s) complet(s) dans le système CAPILLARYS par l'orifice d'entrée situé au milieu de l'appareil. Treize portoirs peuvent être introduits successivement et de nouveaux portoirs pourront être introduits en continu au fur et à mesure des analyses. Lors de l'utilisation d'un sérum de contrôle, utiliser le portoir n° 0 spécifique prévu à cet effet.
7. Retirer du plateau de sortie, situé à gauche de l'appareil, les portoirs dont le contenu des tubes a déjà été analysé.
8. Retirer avec précaution la barrette de dilution usagée et la jeter.

**ATTENTION :** *Manipuler avec précaution les barrettes de dilution contenant des échantillons biologiques.*

#### DILUTION - MIGRATION - DESCRIPTION DES SÉQUENCES AUTOMATIQUES

1. Lecture des codes-barres des tubes primaires d'échantillon et du portoir.
2. Dilution des sérums dans le tampon d'analyse, avec rinçage de l'aiguille de prélèvement entre chaque dilution.
3. Lavage des capillaires.

4. Injection des échantillons dilués dans les capillaires.
5. Migration à voltage constant en température régulée par effet Peltier, pendant environ 4 minutes.
6. Lecture à 200 nm et apparition simultanée du profil protéique sur l'écran de l'ordinateur.

**NOTE :** Ces étapes sont effectuées les unes après les autres pour le premier portoir introduit : les profils correspondant aux tubes analysés sont obtenus après 10 minutes. Pour le portoir suivant, les phases 1 et 2 (lecture des codes-barres et dilution des sérums) se font en temps masqué, pendant la phase 5 du portoir précédent.

## II. TRAITEMENT DES DONNÉES

Dès la fin de l'analyse, la quantification relative des fractions est automatiquement effectuée et les profils peuvent être analysés. À partir de la concentration totale en protéines de l'échantillon, il est alors possible de calculer les concentrations de chaque fraction.

Les profils électrophorétiques sont analysés visuellement pour détecter les anomalies.

Les profils sont présentés par défaut en mode redessiné : ce mode rapproche la fraction alpha-1 du pic d'albumine.

En option, le mode standard permet d'afficher la courbe initiale ou courbe brute.

LIRE ATTENTIVEMENT LE MANUEL D'INSTRUCTIONS DE CAPILLARYS.

## III. FIN DE SÉQUENCE D'ANALYSE

Une procédure d'extinction doit être lancée par l'opérateur en fin de session de travail afin de conserver les capillaires dans des conditions optimales.

## IV. REMPLISSAGE DES FLAcons DE RÉACTIFS

L'automate CAPILLARYS permet une gestion automatique des réactifs.

**IMPORTANT :** Il est nécessaire de suivre la procédure prévue pour le changement des flacons (risques de dépressurisation des flacons et perturbation des analyses) et de respecter le code couleur flacon – connecteur lors de chaque remplacement de flacon.

L'apparition de la fenêtre de gestion des réactifs indique qu'il est nécessaire de changer un ou plusieurs réactifs :

- mise en place d'un nouveau flacon de tampon d'analyse et / ou,
- remplissage du flacon de lavage avec la solution de lavage reconstituée et / ou,
- remplissage du flacon de rinçage par de l'eau déminéralisée ou distillée filtrée et / ou,
- vidange du flacon de vidange.

**ATTENTION :** Ne pas utiliser d'eau déminéralisée du commerce, eau pour fer à repasser par exemple (risque de détérioration importante des capillaires). Utiliser exclusivement de l'eau de qualité ultrapure, type eau pour préparation injectable.

**IMPORTANT :** Avant de remplir le flacon de rinçage, il est recommandé de le rincer abondamment avec de l'eau déminéralisée ou distillée.

VOIR LE MANUEL D'INSTRUCTIONS DE CAPILLARYS.

## CONTRÔLE QUALITÉ

À chaque début de session de travail, il est recommandé d'inclure une série d'analyses avec un sérum de contrôle.

## RÉSULTATS

### Valeurs

La détection directe sur le capillaire à 200 nm permet de définir les concentrations relatives (pourcentages) de chaque fraction.

Les valeurs de référence (moyenne  $\pm$  2 écarts types) pour chaque fraction sérique ont été établies à partir d'une population de 246 adultes normolipémiques (hommes et femmes), en bonne santé :

	CAPILLARYS PROTEIN(E) 6
Albumine	55,8 - 66,1 %
Alpha-1 globulines	2,9 - 4,9 %
Alpha-2 globulines	7,1 - 11,8 %
Bêta globulines	8,4 - 13,1 %
Bêta-1 globulines	4,7 - 7,2 %
Bêta-2 globulines	3,2 - 6,5 %
Gamma globulines	11,1 - 18,8 %

Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs de référence.

**NOTE :** Les valeurs de référence ont été obtenues avec les paramètres d'intégration par défaut du logiciel PHORESIS (lissage 2 et dérive automatique).

### Interprétation

Une déformation du profil par rapport à la normale est le signe d'une anomalie, notamment l'apparition d'un pic fin supplémentaire dans la zone des gammaglobulines.

Le complément C4 migre entre les zones bêta-1 et bêta-2 ; la CRP migre en position bêta-2, voir PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES.

L'augmentation relative de la fraction bêta-2 par rapport à la fraction bêta-1 en dehors d'un contexte de maladie inflammatoire, doit constituer un signal d'alerte nécessitant d'effectuer des investigations complémentaires.

En cas de doute sur l'interprétation du profil et / ou sur le positionnement des minima (notamment lors de l'analyse de contrôle externe), il est nécessaire de superposer le profil obtenu avec celui du Sérum de Contrôle Normal (SEBIA, référence N° 4785).

La présence d'un composant monoclonal dans le sérum peut être suspectée si un profil protéique isolé est retardé ou déformé ou dans le cas de l'impossibilité pour le logiciel (version de PHORESIS  $\geq$  8.63) de redessiner la zone albumine / alpha-1. Le message d'alerte suivant apparaît alors à l'écran sur le profil électrophorétique "Warning: Migration time out of range" avec un triangle rouge d'alerte. Ce triangle rouge d'alerte est aussi affiché sur la mosaïque des courbes et dans le tableau de résultats pour l'échantillon concerné. Dans ce cas, il conviendra d'effectuer un traitement réducteur au bêta-mercaptoéthanol et de renouveler l'analyse pour confirmer la présence d'une paraprotéine dans l'échantillon. Préparer une solution réductrice en ajoutant 1 % de bêta-mercaptoéthanol dans le Fluidil (SEBIA, référence N° 4587, 1 flacon de 5 mL). Le système CAPILLARYS en attente de portoir, prétraiter l'échantillon par cette solution en ajoutant 100  $\mu$ L de solution réductrice à 300  $\mu$ L de sérum pur. Agiter au vortex et laisser en contact 15 minutes maximum puis suivre la technique.

**IMPORTANT** : Après traitement réducteur au beta-mercaptoéthanol, l'échantillon doit être analysé immédiatement ; il ne doit alors pas y avoir de portoir en attente d'analyse dans le système CAPILLARYS.

Si plusieurs profils électrophorétiques présentent la même alarme, contacter le Service Technique SEBIA.

Tout aspect monoclonal ou oligoclonal doit être confirmé à l'aide :

- du kit d'immunotypage SEBIA, CAPILLARYS IMMUNOTYPING ou,
- des kits d'immunofixation SEBIA, HYDRAGEL IF.

Pour des informations complémentaires sur l'interprétation des profils obtenus, voir BIBLIOGRAPHIE.

Zone alpha-2 :

- Certains échantillons peuvent présenter un dédoublement selon le phénotype d'haptoglobine, voir PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES.

### Interférences et limites

Voir ÉCHANTILLONS À ANALYSER.

La présence dans l'échantillon en concentration importante de lipoprotéines / triglycérides ou de pigments biliaires (avec une coloration du sérum jaune – verte caractéristique) peut donner l'impression d'une bisalbuminémie sur le profil électrophorétique.

En cas de suspicion de contamination (extrêmement rare) entre deux échantillons, liée à la présence de certaines protéines monoclonales (en forte concentration, par exemple), il est recommandé de renouveler le test sur les échantillons incriminés (contaminants et potentiellement contaminés) soit en inversant leur ordre d'analyse, soit en sélectionnant le lavage spécifique de l'aiguille de prélèvement entre deux échantillons, associé au programme d'analyses "PROTEIN(E) 6" (option "Lavage de l'aiguille").

Une option permet en effet d'effectuer ce lavage spécifique pour tous les échantillons analysés dans la technique CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 (NB : la cadence d'analyses est divisée par 2).

LIRE ATTENTIVEMENT LE MANUEL D'INSTRUCTIONS DE CAPILLARYS.

Compte-tenu des principes analytiques des techniques actuelles (principes de l'électrophorèse de zone, résolution et sensibilité), aucune garantie ne peut être donnée quant à la détection totale de toutes les composantes monoclonales.

La présence d'une immunoglobuline monoclonale peut ne pas être détectée (par exemple, cas d'une immunoglobuline polymérisée, étalée ou masquée dans le fond polyclonal) ; à l'inverse, une légère déformation du profil peut sembler indiquer la présence d'une immunoglobuline monoclonale, dans tous les cas le contexte clinique doit être analysé et s'il laisse suspecter une gammopathie, il est alors recommandé de réaliser un immunotypage. Si un doute persiste, le résultat obtenu sera à confirmer par une technique d'immunofixation sur gel d'agarose.

### Assistance technique

Contacter le Service Technique SEBIA en cas de test défectueux.

Les fiches de données de sécurité des différents réactifs du kit ainsi que les informations relatives au nettoyage et à l'élimination des déchets, aux règles d'étiquetage et de sécurité appliquées par SEBIA, à l'emballage de transport pour les échantillons biologiques et à la décontamination des appareils sont disponibles dans l'espace Clients du site internet SEBIA : [www.sebia.com](http://www.sebia.com).

### PERFORMANCES

Les résultats suivants, obtenus avec le kit CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 sur le système CAPILLARYS par analyse quantitative indiquent une très bonne répétabilité et reproductibilité du kit CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 pour tous les aspects testés, avec un coefficient de variation moyen de l'ordre de 2,0 % sur les pourcentages de chaque fraction.

Les pourcentages des différentes fractions protéiques ont été obtenus avec les paramètres d'intégration par défaut du logiciel (lissage 2 et dérive automatique).

## Annexe V : Fiche technique du dosage du taux de protides

### NAME

TOTAL PROTEIN

### INTENDED USE

The Total Protein assay is used for the quantitation of total protein in human serum or plasma.

### SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST

Plasma proteins derive primarily from synthesis in the liver, plasma cells, lymph nodes, spleen, and bone marrow. In disease states both the total plasma protein level and the ratio of the individual fractions may be dramatically altered from their normal values. Hypoproteinemia may be caused by such conditions as nephrotic syndrome, extensive bleeding, sprue (deficient protein absorption), severe burns, salt retention syndromes, and Kwashiorkor (acute protein starvation). Hyperproteinemia may be observed in cases of severe dehydration and disease states such as multiple myeloma. Changes in the proportions of the plasma proteins may occur in one or several of the protein fractions and often without alterations in the quantity of the total protein. The A/G ratio has commonly been used as an index of the distribution between the albumin and globulin fractions. This ratio can be significantly altered in such conditions as cirrhosis of the liver, glomerulonephritis, nephrotic syndrome, acute hepatitis, lupus erythematosus, and in some acute and chronic infections.

### PRINCIPLES OF PROCEDURE

Polypeptides containing at least two peptide bonds react with biuret reagent. In alkaline solution, cupric ion forms a coordination complex with protein nitrogen with very little difference between albumin and globulin on a protein-nitrogen basis.

**Methodology:** Biuret

### REAGENTS

#### Reagent Kit

[REF] 7D73 Total Protein is supplied as a liquid, ready-to-use, single reagent kit which contains:

[R1] 10 x 84 mL

Estimated tests per kit: 3,622

Calculation is based on the minimum reagent fill volume per kit.

Reactive Ingredients	Concentration
Sodium Potassium Tartrate	23.4 mmol/L
Sodium Hydroxide	613 mmol/L
Potassium Iodide	6.6 mmol/L
Copper Sulfate	13.2 mmol/L

### REAGENT HANDLING AND STORAGE

#### Reagent Handling

Remove air bubbles, if present in the reagent cartridge, with a new applicator stick. Alternatively, allow the reagent to sit at the appropriate storage temperature to allow the bubbles to dissipate. To minimize volume depletion, do not use a transfer pipette to remove the bubbles.

**CAUTION:** Reagent bubbles may interfere with proper detection of reagent level in the cartridge, causing insufficient reagent aspiration which could impact results.

#### Reagent Storage

Unopened reagents are stable until the expiration date when stored at 15 to 30°C.

Reagent stability is 23 days if the reagent is uncapped and onboard.

### WARNINGS AND PRECAUTIONS

#### Precautions for Users

- For in vitro diagnostic use.
- Do not use components beyond the expiration date.
- Do not mix materials from different kit lot numbers.
- CAUTION:** This product requires the handling of human specimens. It is recommended that all human sourced materials be considered potentially infectious and handled in accordance with the OSHA Standard on Bloodborne Pathogens<sup>1</sup>. Biosafety Level 2<sup>2</sup> or other appropriate biosafety practices<sup>3,4</sup> should be used for materials that contain or are suspected of containing infectious agents.
- [R1] contains sodium hydroxide and copper sulfate and is classified per applicable European Community (EC) Directives as: Irritant (Xi). The following are the appropriate Risk (R) and Safety (S) phrases:



R38	Irritating to skin.
R41	Risk of severe damage to eyes.
R52/53	Harmful to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.
S26	In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice immediately.
S35	This material and its container must be disposed of in a safe way.
S36/37/39	Wear suitable protective clothing, gloves, and eye/face protection.
S46	If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label.
S61	Avoid release in the environment. Refer to special instructions/safety data sheet.

### SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

#### Suitable Specimens

Serum and plasma are acceptable specimens.

- Serum:** Use serum collected by standard venipuncture techniques into glass or plastic tubes with or without gel barriers. Ensure complete clot formation has taken place prior to centrifugation. Separate serum from red blood cells or gel as soon after collection as possible.

Some specimens, especially those from patients receiving anticoagulant or thrombolytic therapy, may take longer to complete their clotting processes. Fibrin clots may subsequently form in these sera and the clots could cause erroneous test results.

- Plasma:** Use plasma collected by standard venipuncture techniques into glass or plastic tubes. Acceptable anticoagulants are lithium heparin (with or without gel barrier) and sodium heparin. Ensure centrifugation is adequate to remove platelets. Separate plasma from red blood cells or gel as soon after collection as possible.

Refer to the specimen collection tube manufacturer's instructions for processing and handling requirements.

For total sample volume requirements, refer to the instrument-specific ASSAY PARAMETERS section of this package insert and Section 5 of the instrument-specific operations manual.

#### Specimen Storage

**Serum and plasma:** Total protein is stable in serum and plasma for 1 week at room temperature, for at least 1 month when refrigerated, and for up to 2 months at -20°C.<sup>5</sup>

An in-house study confirmed total protein is stable in serum for 34 days at 2 to 8°C.

**NOTE:** Stored specimens must be inspected for particulates. If present, mix and centrifuge the specimen to remove particulates prior to testing.

### PROCEDURE

#### Materials Provided

[REF] 7D73 Total Protein Reagent Kit

#### Materials Required but not Provided

- [REF] 1E65 Multiconstituent Calibrator, [CAL1-2] 3 x 5 mL
- Control Material
- Saline (0.85% to 0.90% NaCl) for specimens that require dilution

#### Assay Procedure

For a detailed description of how to run an assay, refer to Section 5 of the instrument-specific operations manual.

## PROCEDURE (Continued)

### Specimen Dilution Procedures

The ARCHITECT cSystems and the AEROSET System have automatic dilution features; refer to *Section 2* of the instrument-specific operations manual for additional information.

**Serum and plasma:** Specimens with total protein values exceeding 18.4 g/dL (184 g/L) are flagged and may be diluted using the Automated Dilution Protocol or the Manual Dilution Procedure.

### Automated Dilution Protocol

If using the Automated Dilution Protocol, the system performs a dilution of the specimen and automatically corrects the concentration by multiplying the result by the appropriate dilution factor. To set up the automatic dilution feature, refer to *Section 2* of the instrument-specific operations manual for additional information.

### Manual Dilution Procedure

Manual dilutions should be performed as follows:

- Use saline (0.85% to 0.90% NaCl) to dilute the sample.
- The operator must enter the dilution factor in the patient or control order screen. The system uses this dilution factor to automatically correct the concentration by multiplying the result by the entered factor.
- If the operator does not enter the dilution factor, the result must be multiplied by the appropriate dilution factor before reporting the result.

**NOTE:** If a diluted sample result is flagged indicating it is less than the linear low limit, do not report the result. Rerun using an appropriate dilution.

For detailed information on ordering dilutions, refer to *Section 5* of the instrument-specific operations manual.

## CALIBRATION

Calibration is stable for approximately 23 days (552 hours) and is required with each change in reagent lot number. Verify calibration with at least two levels of controls according to the established quality control requirements for your laboratory. If control results fall outside acceptable ranges, recalibration may be necessary.

For a detailed description of how to calibrate an assay, refer to *Section 6* of the instrument-specific operations manual.

For information on calibrator standardization, refer to the Multiconstituent Calibrator package insert.

## QUALITY CONTROL

The following is the recommendation of Abbott Laboratories for quality control. As appropriate, refer to your laboratory standard operating procedure(s) and/or quality assurance plan for additional quality control requirements and potential corrective actions.

- Two levels of controls (normal and abnormal) are to be run every 24 hours.
- If more frequent control monitoring is required, follow the established quality control procedures for your laboratory.
- If quality control results do not meet the acceptance criteria defined by your laboratory, patient values may be suspect. Follow the established quality control procedures for your laboratory. Recalibration may be necessary.
- Review quality control results and acceptance criteria following a change of reagent or calibrator lot.

## RESULTS

Refer to the instrument-specific operations manual for information on results calculations.

- ARCHITECT System Operations Manual—Appendix C
- AEROSET System Operations Manual—Appendix A

Representative performance data are given in the EXPECTED VALUES and SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS sections of this package insert. Results obtained in individual laboratories may vary.

## LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Refer to the SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING and SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS sections of this package insert.

## EXPECTED VALUES

### Reference Range

#### Serum<sup>6</sup>

	Range (g/dL)	Range (g/L)
Premature	3.6 to 6.0	36 to 60
Newborn	4.6 to 7.0	46 to 70
Cord	4.8 to 8.0	48 to 80
1 week	4.4 to 7.6	44 to 76
7 months to 1 year	5.1 to 7.3	51 to 73
1 to 2 years	5.6 to 7.5	56 to 75
≥ 3 years	6.0 to 8.0	60 to 80
Adult, Ambulatory	6.4 to 8.3	64 to 83
Adult, Recumbent	6.0 to 7.8	60 to 78
> 60 years	lower by ~ 0.2	lower by ~ 2

To convert results from g/dL to g/L, multiply g/dL by 10.

#### Plasma

Plasma values are generally 0.3 to 0.5 g/dL higher than serum values due to the presence of fibrinogen.<sup>7</sup> This difference has been shown to vary among specific populations.<sup>8</sup>

It is recommended that each laboratory determine its own reference range based upon its particular locale and population characteristics.

## SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Linearity

Total Protein is linear up to 18.4 g/dL (184 g/L). Linearity was verified using Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) protocol NCCLS EP6-P.<sup>9</sup>

### Limit of Detection (LOD)

The LOD for Total Protein is 0.5 g/dL (5.0 g/L). The LOD is the mean concentration of an analyte-free sample + 2 SD, where SD = the pooled, within-run standard deviation of the analyte-free sample. A study performed on an ARCHITECT cSystem and an AEROSET System produced an LOD for Total Protein of 0.07 g/dL (0.7 g/L).

### Limit of Quantitation (LOQ)

The LOQ for Total Protein is 0.76 g/dL (7.6 g/L). The LOQ is the analyte concentration at which the CV = 20%.

### Interfering Substances<sup>10</sup>

Interference studies were conducted using CLSI protocol NCCLS EP7-P.<sup>11</sup> Interference effects were assessed by Dose Response and Paired Difference methods, at the medical decision level of the analyte.

Interfering Substance	Interferent Concentration	N	Target (g/dL)	Observed (% of Target)
Bilirubin	30 mg/dL (513 μmol/L)	3	6.6	96.2
	60 mg/dL (1,026 μmol/L)	3	6.6	93.4
Hemoglobin	125 mg/dL (1.25 g/L)	3	5.2	106.2
	250 mg/dL (2.50 g/L)	3	5.2	112.1
Human triglyceride	750 mg/dL (8.5 mmol/L)	4	8.9	100.2
	1,000 mg/dL (11.3 mmol/L)	4	8.9	99.5

Bilirubin solutions at the above concentrations were prepared by addition of a bilirubin stock to human serum pools. Hemoglobin solutions at the above concentrations were prepared by addition of hemolysate to human serum pools. Human triglyceride solutions at the above concentrations were prepared by mixing a high triglyceride level human serum pool with a normal triglyceride level human serum pool.

## Annexe VI : Fiche technique du dosage de la bilirubine totale

### NAME

TOTAL BILIRUBIN

### INTENDED USE

The Total Bilirubin assay is used for the quantitative analysis of total bilirubin in human serum or plasma of adults and neonates.

### SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST

Red blood cells at the end of their circulating lives are broken down in the reticuloendothelial system, mainly the spleen. The resulting heme is converted to bilirubin upon removal of iron. This process accounts for about 80% of the 500 µmol (292 mg) of bilirubin formed daily. Other sources of bilirubin include the breakdown of myoglobin and cytochromes and the catabolism of immature red blood cells in the bone marrow.

Once formed, bilirubin is transported to the liver bound to albumin. This fraction of bilirubin is referred to as indirect or unconjugated bilirubin. In the liver, bilirubin is conjugated to glucuronic acid (mono- and diglucuronides) by the enzyme uridyl diphosphate glucuronyl transferase to form conjugated bilirubin. Conjugated bilirubin or direct bilirubin is excreted via the biliary system into the intestine, where it is metabolized by bacteria to a group of products known collectively as stercobilinogen. Elimination is almost complete and serum levels are normally negligible.

Total bilirubin is the sum of the unconjugated and conjugated fractions. Total bilirubin is elevated in hepatitis, cirrhosis, hemolytic disorders, several inherited enzyme deficiencies, and conditions causing hepatic obstruction.

Neonatal bilirubin quantitation is used to monitor diseases causing jaundice in the newborn, chiefly erythroblastosis fetalis (also called hemolytic disease of the newborn or HDN). HDN is caused by maternal alloimmunization to RhD, antibodies involving additional blood groups, and ABO incompatibility.<sup>1</sup>

The average full-term newborn infant has a peak serum bilirubin concentration of 5 to 6 mg/dL (86 to 103 µmol/L). Physiologic jaundice is seen at serum bilirubin concentrations from 7 to 17 mg/dL (120 to 291 µmol/L). Serum bilirubin concentrations greater than 17 mg/dL may be pathologic. The primary concern is the potential for bilirubin encephalopathy or kernicterus. The term "kernicterus" was introduced in the early 1900s to refer to the yellow staining of the basal ganglia observed in infants who died with severe jaundice.<sup>2</sup>

Additional causes of neonatal jaundice are hematoma/hemorrhage, hypothyroidism, Crigler-Najjar syndrome, obstructive jaundice, galactosemia, sepsis, syphilis, toxoplasmosis, cytomegalovirus, rubella, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) deficiency, pyruvate kinase deficiency, and spherocytosis.<sup>1,2</sup>

### PRINCIPLES OF PROCEDURE

Traditional methods of measuring bilirubin are based on the reaction of bilirubin with a diazo reagent to form the colored compound azobilirubin. The diazo reaction can be accelerated by the addition of various chemicals. For example, Malloy-Evelyn<sup>3</sup> used methanol, Jendrassik-Gróf<sup>4</sup> used caffeine, and Walters-Gerard<sup>5</sup> used dimethyl sulfoxide (DMSO). Modifications of these methods included the addition of surfactants as solubilizing agents.<sup>6</sup>

Total (conjugated and unconjugated) bilirubin couples with a diazo reagent in the presence of a surfactant to form azobilirubin. The diazo reaction is accelerated by the addition of surfactant as a solubilizing agent. The increase in absorbance at 548 nm due to azobilirubin is directly proportional to the total bilirubin concentration.

**Methodology:** Diazonium Salt

### REAGENTS

#### Reagent Kit

[REF] 6L45 Total Bilirubin is supplied as a liquid, ready-to-use, two-reagent kit which contains:

[REF] 6L45-20

[R1] 10 x 53 mL

[R2] 10 x 17 mL

Estimated tests per kit: 2,750\*

[REF] 6L45-40

[R1] 8 x 93 mL

[R2] 8 x 28 mL

Estimated tests per kit: 3,840\*

\* Calculations are based on the minimum reagent fill volume per kit.

### REAGENTS (Continued)

#### Reagent Kit (Continued)

Reactive Ingredients	Concentration
[R1] Surfactants	4.51%
HCl	8.204 g/L
[R2] 2, 4-dichloroaniline	0.81 g/L
HCl	5.563 g/L
Sodium Nitrite	0.345 g/L
Surfactant	2.00%

### REAGENT HANDLING AND STORAGE

#### Reagent Handling

**NOTE:** Do not invert reagent cartridges prior to use. Reagents are susceptible to the formation of foam and bubbles.

Remove air bubbles, if present in the reagent cartridge, with a new applicator stick. Alternatively, allow the reagent to sit at the appropriate storage temperature to allow the bubbles or foam to dissipate. To minimize volume depletion, do not use a transfer pipette to remove the bubbles.

**CAUTION:** Reagent bubbles may interfere with proper detection of reagent level in the cartridge, causing insufficient reagent aspiration which could impact results.

#### Reagent Storage

Unopened reagents are stable until the expiration date when stored at 2 to 8°C and protected from light. Store Total Bilirubin reagents in the box.

Reagent stability is 21 days if the reagent is uncapped and onboard.

#### Indications of Deterioration

Deterioration should be suspected if there are visible signs of leakage, extreme turbidity, microbial growth, or if quality control results are outside of the acceptable range defined by your laboratory.

### WARNINGS AND PRECAUTIONS

#### Precautions for Users

1. For in vitro diagnostic use.
2. Do not use components beyond the expiration date.
3. Do not mix materials from different kit lot numbers.
4. [R1] and [R2] contain hydrochloric acid and are classified per applicable European Community (EC) Directives as: Corrosive (C). The following are the appropriate Risk (R) and Safety (S) phrases:



- |           |   |
|-----------|---|
| R34       | Causes burns.   |
| S26       | In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. |
| S35       | This material and its container must be disposed of in a safe way.                            |
| S36/37/39 | Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.                            |
| S45       | In case of accident or if you feel unwell, seek   |

medical advice immediately (show the label where possible).

5. **CAUTION:** This product requires the handling of human specimens. It is recommended that all human sourced materials be considered potentially infectious and handled in accordance with the OSHA Standard on Bloodborne Pathogens,<sup>7</sup> Biosafety Level 2<sup>8</sup> or other appropriate biosafety practices<sup>9,10</sup> should be used for materials that contain or are suspected of containing infectious agents.

## SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

### Suitable Specimens

Serum and plasma are acceptable specimens.

- **Serum:** Use serum collected by standard venipuncture or capillary collection techniques into glass or plastic tubes with or without gel barriers. Ensure complete clot formation has taken place prior to centrifugation. Separate serum from red blood cells or gel as soon after collection as possible.

Some specimens, especially those from patients receiving anticoagulant or thrombolytic therapy, may take longer to complete their clotting processes. Fibrin clots may subsequently form in these sera and the clots could cause erroneous test results.

- **Plasma:** Use plasma collected by standard venipuncture or capillary collection techniques into glass or plastic tubes. Acceptable anticoagulants are lithium heparin (with or without gel barrier), sodium heparin, and EDTA. The use of tubes containing sodium fluoride/potassium oxalate is not recommended due to the potential for hemolysis with this anticoagulant. Ensure centrifugation is adequate to remove platelets. Separate plasma from red blood cells or gel as soon after collection as possible.

Refer to the specimen collection tube manufacturer's instructions for processing and handling requirements.

For total sample volume requirements, refer to the instrument-specific ASSAY PARAMETERS section of this package insert and *Section 5* of the instrument-specific operations manual.

### Specimen Storage

**Serum and plasma:** Specimens should be protected from bright light as bilirubin is photolabile.<sup>11</sup> Bilirubin is stable in serum and plasma as follows:

Temperature	Maximum Storage	Bibliographic Reference
20 to 25°C	1 day	12
2 to 8°C	7 days	12, 13
-20°C	6 months	14
-80°C	6 months	14

Limitations of laboratory equipment make it necessary in practice for clinical laboratories to establish a range around -20°C and/or -80°C for specimen storage. The temperature ranges may be established from either the freezer manufacturer's specifications or your laboratory standard operating procedure(s) for specimen storage.

**NOTE:** Stored specimens must be inspected for particulates. If present, mix and centrifuge the specimen to remove particulates prior to testing.

## PROCEDURE

### Materials Provided

[REF] 6L45-20 or 6L45-40 Total Bilirubin Reagent Kit

### Materials Required but not Provided

- [REF] 1E66 Bilirubin Calibrator, [CAL1-2] 3 x 5 mL
- Control Material
- Saline (0.85% to 0.90% NaCl) for specimens that require dilution

### Assay Procedure

For a detailed description of how to run an assay, refer to *Section 5* of the instrument-specific operations manual.

### Specimen Dilution Procedures

The ARCHITECT *c*Systems and AEROSET System have automatic dilution features; refer to *Section 2* of the instrument-specific operations manual for additional information.

**Serum and plasma:** Specimens with total bilirubin values exceeding 25.0 mg/dL (427.5 µmol/L) are flagged and may be diluted using the Automated Dilution Protocol or the Manual Dilution Procedure.

## PROCEDURE (Continued)

### Specimen Dilution Procedures (Continued)

#### Automated Dilution Protocol

If using the Automated Dilution Protocol, the system performs a 1:5 or a 1:10 dilution of the specimen and automatically corrects the concentration by multiplying the result by the appropriate dilution factor.

#### Manual Dilution Procedure

Manual dilutions should be performed as follows:

- Use saline (0.85% to 0.90% NaCl) to dilute the sample.
- The operator must enter the dilution factor in the patient or control order screen. The system uses this dilution factor to automatically correct the concentration by multiplying the result by the entered factor.
- If the operator does not enter the dilution factor, the result must be multiplied by the appropriate dilution factor before reporting the result.

**NOTE:** If a diluted sample result is flagged indicating it is less than the linear low limit, do not report the result. Rerun using an appropriate dilution.

For detailed information on ordering dilutions, refer to *Section 5* of the instrument-specific operations manual.

## CALIBRATION

Calibration is stable for approximately 14 days (336 hours) and is required with each change in reagent lot number. Verify calibration with at least two levels of controls according to the established quality control requirements for your laboratory. If control results fall outside acceptable ranges, recalibration may be necessary.

For a detailed description of how to calibrate an assay, refer to *Section 6* of the instrument-specific operations manual.

For information on calibrator standardization, refer to the Bilirubin Calibrator package insert.

## QUALITY CONTROL

The following is the recommendation of Abbott Laboratories for quality control. As appropriate, refer to your laboratory standard operating procedure(s) and/or quality assurance plan for additional quality control requirements and potential corrective actions.

- Two levels of controls (normal and abnormal) are to be run every 24 hours.
- If more frequent control monitoring is required, follow the established quality control procedures for your laboratory.
- If quality control results do not meet acceptance criteria defined by your laboratory, patient values may be suspect. Follow the established quality control procedures for your laboratory. Recalibration may be necessary.
- Review quality control results and acceptance criteria following a change of reagent or calibrator lot.

## RESULTS

Refer to the instrument-specific operations manual for information on results calculations.

- ARCHITECT System Operations Manual—Appendix C
- AEROSET System Operations Manual—Appendix A

Representative performance data are given in the EXPECTED VALUES and SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS sections. Results obtained in individual laboratories may vary.

## LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Refer to the SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING and SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS sections of this package insert.

### For the AEROSET System ONLY

[REF] 6L45 Total Bilirubin must be configured on a separate line from the following reagents:

- [REF] 6L35 MULTIGENT® Amikacin
- [REF] 6L31 MULTIGENT Quindine
- [REF] 6E44 MULTIGENT Vancomycin

## EXPECTED VALUES

### Reference Range

	Range (mg/dL)	Range (μmol/L)
Adult (serum and plasma) <sup>15</sup>	0.2 to 1.2	3.4 to 20.5

A study was conducted with a similar methodology (Total Bilirubin [REF] 8G62-20) using 135 serum samples from volunteers ranging in age from 25 to 66 years. Data were analyzed as described in Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) protocol NCCLS C28-A.<sup>16</sup> From this study, 95% of all results were within 0.2 to 1.2 mg/dL with results ranging from 0.2 to 1.8 mg/dL.

A confirmation study was conducted with [REF] 6L45 Total Bilirubin using 25 serum and plasma samples from adult volunteers. Data were analyzed as described in CLSI protocol NCCLS C28-A.<sup>17</sup> From this study, all results were within the range of 0.2 to 0.9 mg/dL, confirming the adult reference interval of 0.2 to 1.2 mg/dL.

	Range (mg/dL)	Range (μmol/L)
Premature (serum) <sup>18</sup>		
< 24 hours	< 8.0	< 136.8
< 48 hours	< 12.0	< 205.2
3 to 5 days	< 15.0	< 256.5
7 days	< 15.0	< 256.5
Full-term Newborn (serum) <sup>18</sup>		
< 24 hours	< 6.0	< 102.6
< 48 hours	< 10.0	< 171.0
3 to 5 days	< 12.0	< 205.2
7 days	< 10.0	< 171.0

For additional information on neonatal bilirubin values, refer to the American Academy of Pediatrics recommendation in *Management of Hyperbilirubinemia in the Newborn Infant 35 or More Weeks of Gestation*.<sup>19</sup>

To convert results from mg/dL to μmol/L, multiply mg/dL by 17.1.

It is recommended that each laboratory determine its own reference range based upon its particular locale and population characteristics.

## SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Linearity

Linearity for Total Bilirubin is 0.1 to 25.0 mg/dL (1.71 to 427.5 μmol/L). Linearity was verified using a modified CLSI protocol NCCLS EP6-A.<sup>20</sup>

### Limit of Detection (LOD)

The LOD for Total Bilirubin is 0.05 mg/dL (0.86 μmol/L). LOD is the lowest amount of analyte in a sample that can be detected with 95% probability.

### Limit of Quantitation (LOQ)

The LOQ for Total Bilirubin is ≤ 0.1 mg/dL (≤ 1.71 μmol/L). The LOQ is the analyte concentration at which the CV = 20%.

### Interfering Substances<sup>21</sup>

Potential interference in the Total Bilirubin assay from 1,000 mg/dL hemoglobin, 500 mg/dL Intralipid, or 0.125 mmol/L Indican (indoxyl sulfate) is ≤ 10% or ± 0.3 mg/dL, whichever is greater.

Interference effects were assessed by Dose Response method, at the medical decision levels of the analyte.

Interfering Substance	Interferent Concentration	N	Target (mg/dL)	Observed* (mg/dL)	(%)
Hemoglobin	1,000 mg/dL (10 g/L)	7	1.1	0.9	86
	2,000 mg/dL (20 g/L)	7	1.1	0.9	80
	1,000 mg/dL (10 g/L)	7	16.4	15.7	96
	2,000 mg/dL (20 g/L)	7	16.4	15.5	95
Intralipid	1,000 mg/dL (10 g/L)	7	1.0	1.2	115
	2,000 mg/dL (20 g/L)	7	1.0	1.4	136
	1,000 mg/dL (10 g/L)	7	16.6	16.6	100
	2,000 mg/dL (20 g/L)	7	16.6	16.8	101

\* Percentages have been rounded to whole numbers.

## SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS (Continued)

### Interfering Substances<sup>21</sup> (Continued)

Hemoglobin solutions at the above concentrations were prepared by addition of hemolysate to solutions of human serum albumin. Intralipid solutions at the above concentrations were prepared by addition of Intralipid to solutions of human serum albumin.

Taki et al. reported indoxyl sulfate concentrations up to 8.62 mg/dL (0.40 mmol/L), with an average of 3.52 mg/dL (0.17 mmol/L), in 224 hemodialysis (HD) patients.<sup>22</sup> Indoxyl sulfate falsely increases bilirubin results when assayed by this methodology; however, the use of an earlier read time has been shown to reduce Indican interference.<sup>23</sup> Testing at Abbott Laboratories (Main Read Time 20-22) demonstrated that addition of 0.18 mmol/L 3-indoxyl sulfate potassium salt, at a targeted total bilirubin of 1.2 mg/dL, increased the total bilirubin concentration by 0.3 mg/dL.

### Precision

The imprecision of the Total Bilirubin assay is ≤ 5% Total CV.

Representative data from studies using CLSI protocol NCCLS EP5-A2<sup>24</sup> are summarized below.

	Control	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4
N	80	80	80	80	80
Mean (mg/dL)	0.81	4.07	6.03	16.09	
Within Run	SD	0.01	0.02	0.03	0.12
	%CV	1.0	0.5	0.6	0.7
Between Run	SD	0.01	0.04	0.04	0.03
	%CV	0.7	0.9	0.6	0.2
Between Day	SD	0.01	0.08	0.10	0.17
	%CV	1.2	1.9	1.6	1.1
Total	SD	0.01	0.09	0.11	0.21
	%CV	1.7	2.1	1.8	1.3

### Method Comparison

Correlation studies were performed using CLSI protocol NCCLS EP9-A2.<sup>25</sup>

Results from the Total Bilirubin assay on an ARCHITECT c System and the AEROSSET System were compared with those from a commercially available liquid 2,5-dichloro-phenyldiazonium tetrafluoroborate methodology.

Results from the Total Bilirubin assay on an ARCHITECT c System were compared with those from the Total Bilirubin assay on the AEROSSET System.

\*\*\*

### Adult

Serum and Plasma	ARCHITECT vs. Comparative Method	AEROSSET vs. Comparative Method	ARCHITECT vs. AEROSSET
N	137	137	137
Y - Intercept	0.20	0.22	-0.02
Correlation Coefficient	0.999	0.999	1.000
Slope	0.95	0.96	0.99
Range (mg/dL)	0.2 to 24.4	0.2 to 24.4	0.3 to 22.8

### Neonatal

Serum*	ARCHITECT vs. Comparative Method	AEROSSET vs. Comparative Method	ARCHITECT vs. AEROSSET
N	52	52	52
Y - Intercept	0.06	0.22	-0.13
Correlation Coefficient	0.992	0.993	0.996
Slope	0.98	0.96	1.02
Range (mg/dL)	4.7 to 15.9	4.7 to 15.9	4.8 to 15.8

\* Neonatal serum samples were from patients ≤ 5 days old.

## Annexe VII : Fiche technique du dosage de la bilirubine directe.

### NAME

DIRECT BILIRUBIN

### INTENDED USE

The Direct Bilirubin assay is used for the quantitative analysis of direct bilirubin in human serum or plasma.

### SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST

Red blood cells at the end of their circulating life are broken down in the reticuloendothelial system, mainly the spleen. The resulting heme, once the iron is removed, is then converted to bilirubin. This process accounts for about 80% of the 500 µmol (300 mg) of bilirubin formed daily. Other sources of bilirubin include the breakdown of myoglobin and cytochromes and the catabolism of immature red blood cells in the bone marrow.

Once formed, bilirubin is transported to the liver bound to albumin. This fraction of bilirubin is referred to as indirect or unconjugated bilirubin. In the liver, bilirubin is conjugated to glucuronic acid (mono- and diglucuronides) to form conjugated bilirubin by the enzyme uridyl diphosphate glucuronyl transferase. Conjugated bilirubin or direct bilirubin is excreted via the biliary system into the intestine, where it is metabolized by bacteria to a group of products known collectively as stercobilinogen. Elimination is almost complete and serum levels are normally negligible.

Direct bilirubin is the sum of the conjugated fractions. Direct bilirubin is elevated in conditions causing hepatic obstruction, hepatitis, cirrhosis, several inherited enzyme deficiencies, and inherited defects in canalicular excretion.

### PRINCIPLES OF PROCEDURE

Bilirubin determination is generally based on the reaction of bilirubin with a diazotized sulfanilic acid, described by Ehrlich.<sup>1</sup> In this method, direct (conjugated fractions) bilirubin couples with a diazonium salt in the presence of sulfamic acid to form the colored compound azobilirubin. The increase in absorbance at 548 nm due to azobilirubin is proportional to the direct bilirubin concentration.

**Methodology:** Diazo Reaction

### REAGENTS

#### Reagent Kit

[REF] 8G63 Direct Bilirubin is supplied as a liquid, ready-to-use, two-reagent kit which contains:

[R1] 10 x 39 mL

[R2] 10 x 13 mL

Estimated tests per kit: 2,000

Calculation is based on the minimum reagent fill volume per kit.

Reactive Ingredients	Concentration
----------------------	---------------

[R1]	Sulfamic Acid	9.7 g/L
[R2]	2, 4-dichloroaniline	0.081 g/L
	Sodium Nitrite	0.035 g/L
	HCl	1.68 g/L

### REAGENT HANDLING AND STORAGE

#### Reagent Handling

Remove air bubbles, if present in the reagent cartridge, with a new applicator stick. Alternatively, allow the reagent to sit at the appropriate storage temperature to allow the bubbles to dissipate. To minimize volume depletion, do not use a transfer pipette to remove the bubbles.

**CAUTION:** Reagent bubbles may interfere with proper detection of reagent level in the cartridge, causing insufficient reagent aspiration which could impact results.

#### Reagent Storage

Unopened reagents are stable until the expiration date when stored at 2 to 8°C. The reagents should be clear.

Reagent stability is 28 days if the reagent is uncapped and onboard.

### WARNINGS AND PRECAUTIONS

#### Precautions for Users

1. For in vitro diagnostic use.
2. Do not use components beyond the expiration date.
3. Do not mix materials from different kit lot numbers.
4. **CAUTION:** This product requires the handling of human specimens. It is recommended that all human sourced materials be considered potentially infectious and be handled in accordance with the OSHA Standard on Bloodborne Pathogens,<sup>2</sup> Biosafety Level 2<sup>3</sup> or other appropriate biosafety practices<sup>4,5</sup> should be used for materials that contain or are suspected of containing infectious agents.
5. [R1] contains sulfamic acid and [R2] contains hydrochloric acid. [R1] and [R2] are classified per applicable European Community (EC) Directives as: Corrosive (C). The following are the appropriate Risk (R) and Safety (S) phrases:



- |           |   |
|-----------|---|
| R34       | Causes burns.   |
| S26       | In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.               |
| S35       | This material and its container must be disposed of in a safe way.  |
| S36/37/39 | Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.  |
| S45       | In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible). |

### SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

#### Suitable Specimens

Use serum or plasma specimens without visible hemolysis or lipemia. Refer to the SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS section of this package insert.

Abbott Laboratories has not verified the assay performance characteristics with neonatal specimens.

**NOTE:** Abbott Laboratories recommends the use of sample interference indices in the semi-quantitative mode to assist in the determination of sample integrity for all specimens. Refer to the instrument-specific Sample Interference Indices (HIL) application sheets.

- **Serum:** Use serum collected by standard venipuncture techniques into glass or plastic tubes with or without gel barriers. Ensure complete clot formation has taken place prior to centrifugation.

When processing samples, separate serum from blood cells or gel according to the specimen collection tube manufacturer's instructions.

Some specimens, especially those from patients receiving anticoagulant or thrombolytic therapy, may take longer to complete their clotting processes. Fibrin clots may subsequently form in these sera and the clots could cause erroneous test results.

- **Plasma:** Use plasma collected by standard venipuncture techniques into glass or plastic tubes. Acceptable anticoagulants are lithium heparin (with or without gel barrier), sodium heparin, and EDTA. The use of tubes containing sodium fluoride/potassium oxalate is not recommended due to the potential of hemolysis formation with this anticoagulant. Ensure centrifugation is adequate to remove platelets. When processing samples, separate plasma from blood cells or gel according to the specimen collection tube manufacturer's instructions.

For total sample volume requirements, refer to the instrument-specific ASSAY PARAMETERS section of this package insert and Section 5 of the instrument-specific operations manual.

## SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING (Continued)

### Specimen Storage

**Serum and plasma:** Specimens should be protected from bright light as bilirubin is photolabile.<sup>6</sup> Direct bilirubin is stable in serum and plasma as follows:

Temperature	Maximum Storage	Bibliographic Reference
20 to 25°C	2 days	7
2 to 8°C	7 days	7, 8
-20°C	3 months	9
-80°C	3 months	9

Limitations of laboratory equipment make it necessary in practice for clinical laboratories to establish a range around -20°C and/or -80°C for specimen storage. These temperature ranges may be established from either the freezer manufacturer's specifications or your laboratory standard operating procedure(s) for specimen storage.

**NOTE:** Stored specimens must be inspected for particulates. If present, mix and centrifuge the specimen to remove particulates prior to testing.

## PROCEDURE

### Materials Provided

[REF] 8G63 Direct Bilirubin Reagent Kit

### Materials Required but not Provided

- [REF] 1E66 Bilirubin Calibrator, [CAL]1-2 3 x 5 mL
- Control Material
- Saline (0.85% to 0.90% NaCl) for specimens that require dilution

### Assay Procedure

For a detailed description of how to run an assay, refer to *Section 5* of the instrument-specific operations manual.

### Specimen Dilution Procedures

The ARCHITECT cSystems and AEROSET System have automatic dilution features; refer to *Section 2* of the instrument-specific operations manual for additional information.

**Serum and plasma:** Specimens with direct bilirubin value exceeding 15.0 mg/dL (256.5 µmol/L) are flagged and may be diluted using the Manual Dilution Procedure.

### Automated Dilution Protocol

If using the Automated Dilution Protocol, the system performs a dilution of the specimen and automatically corrects the concentration by multiplying the result by the appropriate dilution factor. To set up the automatic dilution feature, refer to *Section 2* of the instrument-specific operations manual for additional information.

### Manual Dilution Procedure

Manual dilutions should be performed as follows:

- Use saline (0.85% to 0.90% NaCl) to dilute the sample.
- The operator must enter the dilution factor in the patient or control order screen. The system uses this dilution factor to automatically correct the concentration by multiplying the result by the entered factor.
- If the operator does not enter the dilution factor, the result must be multiplied by the appropriate dilution factor before reporting the result.

**NOTE:** If a diluted sample result is flagged indicating it is less than the linear low limit, do not report the result. Rerun using an appropriate dilution.

For detailed information on ordering dilutions, refer to *Section 5* of the instrument-specific operations manual.

## CALIBRATION

Calibration is stable for approximately 14 days (336 hours) and is required with each change in reagent lot number. Verify calibration with at least two levels of controls according to the established quality control requirements for your laboratory. If control results fall outside acceptable ranges, recalibration may be necessary.

For a detailed description of how to calibrate an assay, refer to *Section 6* of the instrument-specific operations manual.

For information on calibrator standardization, refer to the Bilirubin Calibrator package insert.

## QUALITY CONTROL

The following is the recommendation of Abbott Laboratories for quality control. As appropriate, refer to your laboratory standard operating procedure(s) and/or quality assurance plan for additional quality control requirements and potential corrective actions.

- Two levels of controls (normal and abnormal) are to be run every 24 hours.
- If more frequent control monitoring is required, follow the established quality control procedures for your laboratory.
- If quality control results do not meet the acceptance criteria defined by your laboratory, patient values may be suspect. Follow the established quality control procedures for your laboratory. Recalibration may be necessary.
- Review quality control results and acceptance criteria following a change of reagent or calibrator lot.

## RESULTS

Refer to the instrument-specific operations manual for information on results calculations.

- ARCHITECT System Operations Manual—Appendix C
- AEROSET System Operations Manual—Appendix A

Representative performance data are given in the EXPECTED VALUES and SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS sections of this package insert. Results obtained in individual laboratories may vary.

## LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Refer to the SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING and SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS sections of this package insert.

Some specimens may give a direct bilirubin result slightly greater than the total bilirubin result. During internal testing at Abbott Laboratories, specimens with total bilirubin concentrations of 0.2 mg/dL (3.4 µmol/L) or less occasionally gave a direct bilirubin result that slightly exceeded their respective total bilirubin result. This may be observed when nearly all reacting bilirubin is direct bilirubin.

Abbott Laboratories has not verified the assay performance characteristics with neonatal specimens.

For the AEROSET System only: Abbott Clinical Chemistry Direct Bilirubin [REF] 8G63 must be run on a separate line from MULTIGENT® Microalbumin [REF] 2K98.

## EXPECTED VALUES

### Reference Range

#### Serum<sup>10</sup>

	Range (mg/dL)	Range (µmol/L)
Adult	0.0 to 0.5	0.0 to 8.6

To convert results from mg/dL to µmol/L, multiply mg/dL by 17.1.

To convert results from mg/dL to µmol/L, multiply mg/dL by 17.1.

A study was conducted using 135 serum samples from volunteers ranging in age from 25 to 66 years. Data were analyzed as described by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) protocol NCCLS C28-A.<sup>11</sup> From this study, 95% of all specimens fell within 0.0 to 0.5 mg/dL, with samples ranging from 0.1 to 0.6 mg/dL.

It is recommended that each laboratory determine its own reference range based upon its particular locale and population characteristics.

## SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Linearity

Linearity for Direct Bilirubin is 0.1 to 15.0 mg/dL (1.7 to 256.5 µmol/L), with recovery within 10% or within the 95% confidence level of the predicted value. Linearity was verified using a modified CLSI protocol NCCLS EP6-P.<sup>12</sup> A study performed on an ARCHITECT cSystem and an AEROSET System produced linear results for Direct Bilirubin up to 16.9 mg/dL (289.0 µmol/L).

### Limit of Detection (LOD)

The LOD is the Limit of Absence (LOA\*) + 1.645 SD, where SD = the pooled, within-run standard deviation of a low concentration sample. A study performed on an ARCHITECT cSystem and an AEROSET System produced an LOD for Direct Bilirubin of 0.04 mg/dL (0.69 µmol/L).

\* LOA = mean concentration of analyte-free sample + 1.645 SD, where SD = pooled SD of analyte-free sample.

### Limit of Quantitation (LOQ)

The LOQ for Direct Bilirubin is ≤ 0.10 mg/dL (1.71 µmol/L). The LOQ is the analyte concentration at which the CV = 20%. Performance studies produced an LOQ of 0.05 mg/dL (0.86 µmol/L).

### Interfering Substances

Potential interference in the Direct Bilirubin assay from 62 mg/dL hemoglobin, 125 mg/dL Intralipid, or 0.50 mmol/L Indican (indoxyl sulfate) is ≤ 10% or ± 0.1 mg/dL, whichever is greater, at the medical decision level of the analyte.

Interference studies were conducted using a modified CLSI protocol NCCLS EP7-P.<sup>13</sup> Interference effects were assessed by Dose Response and Paired Difference methods, at the medical decision level of the analyte.

Interfering Substance	Interferent Concentration	N	Target (mg/dL)	Difference from Target (mg/dL)
Hemoglobin	31 mg/dL (0.31 g/L)	5	0.4	-0.1
	62 mg/dL (0.62 g/L)	5	0.4	-0.1
	125 mg/dL (1.25 g/L)	5	0.4	-0.2
	250 mg/dL (2.50 g/L)	5	0.4	-0.2
	500 mg/dL (5.00 g/L)	5	0.4	-0.2
Human triglyceride	519 mg/dL (5.86 mmol/L)	5	0.4	-0.1
	1,034 mg/dL (11.68 mmol/L)	5	0.4	+0.3
Intralipid	125 mg/dL (1.25 g/L)	5	0.4	-0.1
	250 mg/dL (2.50 g/L)	5	0.4	+0.1
	500 mg/dL (5.00 g/L)	5	0.4	+0.4

Hemoglobin solutions at the above concentrations were prepared by addition of hemolysate to human serum pools. Human triglyceride solutions at the above concentrations were prepared by mixing an elevated triglyceride human serum pool with a normal triglyceride human serum pool. Intralipid solutions at the above concentrations

were prepared by addition of Intralipid to human serum pools.

Taki et al. reported indoxyl sulfate concentrations up to 8.62 mg/dL (0.40 mmol/L), with an average of 3.52 mg/dL (0.17 mmol/L), in 224 hemodialysis (HD) patients.<sup>14</sup> Indoxyl sulfate does not cause significant interference with this direct bilirubin method. Testing at Abbott Laboratories demonstrated that addition of 12.57 mg/dL (0.50 mmol/L) 3-indoxyl sulfate potassium salt to specimens increased the direct bilirubin concentration by a maximum of 0.1 mg/dL.

Interferences from medications or endogenous substances may affect results.<sup>15</sup>

### Precision

The imprecision of the Direct Bilirubin assay is ≤ 5% Total CV. Representative data from studies using CLSI protocol NCCLS EP5-A<sup>16</sup> are summarized below.

Control		Level 1	Level 2	Level 3	Level 4
N		80	80	80	80
Mean (mg/dL)	SD	0.41	2.11	3.50	8.59
	%CV	0.01	0.01	0.02	0.05
Within Run	SD	2.1	0.6	0.6	0.5
	%CV	0.00	0.04	0.06	0.14
Between Run	SD	0.0	1.7	1.6	1.6
	%CV	0.01	0.04	0.07	0.16
Between Day	SD	3.6	1.8	2.0	1.9
	%CV	0.02	0.05	0.09	0.22
Total	SD	4.1	2.6	2.7	2.6
	%CV				

### Method Comparison

Correlation studies were performed using a modified CLSI protocol NCCLS EP9-A.<sup>17</sup>

Serum results from the Direct Bilirubin assay on an AEROSET System were compared with those from a commercially available methodology based on Jendrassik-Gróf procedure; factored application.

Serum results from the Direct Bilirubin assay on an ARCHITECT cSystem were compared with those from a commercially available methodology based on Jendrassik-Gróf procedure; factored application.

	AEROSET vs. Comparative Method	ARCHITECT vs. Comparative Method
N	129	107
Y - Intercept	0.21	0.21
Correlation Coefficient	0.995	0.996
Slope	1.08	1.08
Range (mg/dL)	0.1 to 9.9	0.1 to 9.9

Serum results from the Direct Bilirubin assay on an AEROSET System were compared with the manual Jendrassik-Gróf method.

Serum results from the Direct Bilirubin assay on an ARCHITECT cSystem were compared with the Direct Bilirubin assay (LN 8G63-20) on an AEROSET System.

	AEROSET vs. Comparative Method	ARCHITECT vs. AEROSET
N	49	107
Y - Intercept	0.31	-0.01
Correlation Coefficient	0.998	0.999

Slope	0.983	1.01
Range (mg/dL)	-0.1 to 15.6	0.1 to 11.1

## **Résumé :**

*L'électrophorèse des protéines sériques est devenue de nos jours un examen complémentaire de grande importance, très utile pour le diagnostic et le suivi de nombreuses pathologies. Cependant le profil électrophorétique peut être influencé par plusieurs interférences analytiques tel que l'hémolyse, fibrinogène et la bilirubine, affectant ainsi sa qualité ce qui pourrait être à l'origine d'interprétations erronées. Ainsi, le biologiste soucieux de la qualité de ses prestations doit attacher une attention particulière à cette étape pour la maîtrise de ce maillon faible. Le présent travail est une étude analytique descriptive porté sur des échantillons sanguins sur tube sec, tube avec anticoagulant (héparinate de lithium), ainsi que sur des échantillons ictériques acheminés au niveau du laboratoire de biochimie du CHU NEDIR MOHAMMED DE TIZI OUZOU pour exploration biochimique et immunologique sur une période s'étalant de 6mois qui a eu pour objectifs principaux de relever les modifications analytiques engendrées par ces interférences sur le profil électrophorétique des protéines sériques en vue de déterminer comment pallier à ces interférences lors de l'interprétation des résultats d'une électrophorèse capillaire des protéines sériques..*

**Mots clé :** *interférences analytiques, protéines sériques, capillaire, capillarys, hémolyse, fibrinogène, bilirubine.*

## **Summary:**

*Electrophoresis of serum proteins has nowadays become a complementary examination of great importance, very useful for the diagnosis and the follow-up of many pathologies. However, the electrophoretic profile can be influenced by several analytical interferences such as hemolysis, fibrinogen and bilirubin, thus affecting its quality, which could lead to misinterpretation. Thus, the biologist concerned about the quality of his services must pay particular attention to this step to control this weak link. The present work is a descriptive analytical study carried out on blood samples on dry tube, anticoagulant tube (lithium heparin) as well as on icteric samples sent to the biochemistry laboratory of the Nedir Mohammed de Tizi Ouzou University Hospital for biochemical and immunological exploration. over a period of 6 months, the main objectives of which were to identify the analytical changes caused by these interferences on the electrophoretic profiles of serum proteins in order to determine how to overcome these interferences when interpreting the results of an electrophoresis capillary of serum proteins.*

**Keywords:** *analytical interference, serum proteins, capillary, capillarys, hemolysis, fibrinogen, bilirubin.*