

Exploration des protéines sériques

I. Introduction

Les protéines sont présentes dans tous les liquides de l'organisme mais ce sont les protéines plasmatiques qui sont le plus souvent explorées dans un but diagnostique. Les protéines représentent la plus grande partie des matières solides du plasma. Ce sont de grosses molécules non dialysables avec une masse moléculaire supérieure à 10000 Da. Elles sont constituées d'enchaînement d'acides aminés unis par des liaisons peptidiques (amides) et d'autres liaisons dans un ordre dicté par le génome. En dehors du fibrinogène (protéines fibreuses), Ce sont toutes des protéines globulaires ; seule l'albumine est une holoprotéine (seulement des acides aminés), toutes les autres étant des hétéroprotéines pouvant contenir des lipides (lipoprotéines), des métaux (métalloprotéines) et surtout des glucides (glycoprotéines). La plupart des protéines plasmatiques sont en effet des glycoprotéines.

II. Rôle des protéines plasmatiques

II.1 Le maintien de la pression oncotique : qui est assurée par l'albumine et secondairement par les autres globulines. La pression oncotique est la pression osmotique due à la présence des protéines et elles représentent un déterminant important de la distribution du liquide extracellulaire entre les compartiments intra et extravasculaires.

II.2 Le transport des substances endogènes et exogènes : le transport de diverses substances endogènes et exogènes à l'instar de l'albumine qui est un transporteur non spécifique. Elle transporte entre autre la bilirubine, les acides gras, le calcium, les hormones et

de nombreux médicaments. Certaines protéines sont spécialisées dans le transport spécifique d'un ligand exp : la transferrine qui transporte le fer, la céruloplasmine qui transporte le cuivre.

II .3 L'inhibition des protéases plasmatiques

Comme l' α_1 antitrypsine, l' α_1 antichymotrypsine et l' α_2 macroglobuline s'opposent à l'action de plusieurs protéases libérées lors de la réaction inflammatoire telle que l'élastase et la collagénase limitant l'action protéolytique sur le tissu conjonctif.

II.4 La coagulation (les facteurs de coagulation) : exp : le fibrinogène.

II.5 L'immunité (γ -globulines : les anticorps (immunoglobulines).

II.6 Enzymes et cofacteurs d'enzymes : Ex : l'orosmucoïde est une glycoprotéine cofacteur de la LPL (Lipoprotéine lipase). Elle se trouve à la surface des épithéliums vasculaires, tissus adipeux, muscles striés squelettiques, sa diminution dans le syndrome néphrotique explique l'hyperlipémie observée au cours de cette pathologie.

III. Métabolisme des protéines plasmatiques

III.1 Biosynthèse : il existe deux principaux centres de biosynthèse : le foie et la lignée lymphocytaire. A l'exception des γ -globulines, la majorité des protéines plasmatiques sont synthétisées par le foie.

III.2 Vitesse de renouvellement (demi-vie) : ps : une demi-vie est le temps mis par une substance (molécule, médicament ou autres) pour perdre la moitié de son activité pharmacologique ou physiologique ou bien c'est le temps nécessaire pour que la quantité d'une substance contenue dans un système biologique soit diminuée de moitié de sa valeur initiale. A partir de la demi-vie d'une protéine, on peut prévoir

le temps que celle-ci mettra pour varier quantitativement exp : la demi-vie d'une albumine est de 19 jours et celle des IgG est de 18 jours.

III.3 Le catabolisme : il se fait dans la circulation par des protéases, mais surtout au niveau hépatique et rénal.

Ps : dans les cas pathologiques, la disparition des protéines plasmatiques de la circulation (hypo-protéinémie) n'est pas uniquement le fait du catabolisme. Ces protéines peuvent passer dans les urines. Les urines normales renferment de faibles quantités de protéines (car elles sont non dialysables) représentant la protéinurie. La protéinurie physiologique est de l'ordre de 250 mg par 24h.

IV. Méthodes d'investigation des protéines plasmatiques

Ces méthodes permettent d'obtenir une analyse simultanée de l'ensemble des protéines plasmatiques et de certaines fractions ; il existe des méthodes quantitatives semi -quantitatives et qualitatives. Elles reposent sur :

- Les propriétés fondamentales des protéines (liaisons peptidiques CO-NH)→Méthodes chimiques.
- Le caractère amphotère des protéines →Méthodes électrophorétiques
- Le caractère immunogène des protéines → Techniques basées sur la réaction Ag-Ac.

IV.1 Dosage des protéines totales : la **méthode de Biuret** est la plus utilisée, les liaisons peptidiques réagissent avec le sulfate de cuivre, en milieu alcalin pour donner une coloration violette dont l'intensité est mesurée à **540 nm**. Elle est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon. Cette méthode est simple et automatisable. Il existe une autre méthode utilisant des réfractomètres ; cette dernière est basée sur l'indice de réfraction du sérum clair qui est proportionnel au taux des protéines plasmatiques. Les valeurs normales de ces protéines (protéinémie totale ou

protidémie totale) pour un adulte est de 60 à 80g/l, pour un nouveau-né est de 50 à 70g/l et pour un prématuré est de 40 à 60g/l.

V.2 Fractionnement des différentes classes des protéines: la méthode la plus utilisée est l'électrophorèse des protéines sur acétate de cellulose. C'est une technique semi-quantitative ; elle sépare les protéines selon leur charge grâce à un champ électrique. On l'utilise toujours en absence de fibrinogène (c'est-à-dire on utilise le sérum sanguin). En effet, le fibrinogène contenu dans le plasma provoque des trainées (traces ou taches) dans toutes les techniques électrophorétiques empêchant leur interprétation.

Le choix du support électrophorétique est essentiel (acétate de cellulose), le pH tampon est généralement de 8.6 (pH alcalin) auquel les protéines s'ionisent comme des anions migrant vers l'anode. Après un temps de migration, puis fixation et coloration, vient la lecture photodensiométrique de chaque bande de protéines colorée donnant le tracé classique ou apparaissent les 5 pics de protéines : albumine, α_1 , α_2 , β et γ globulines (**Figure 01**).

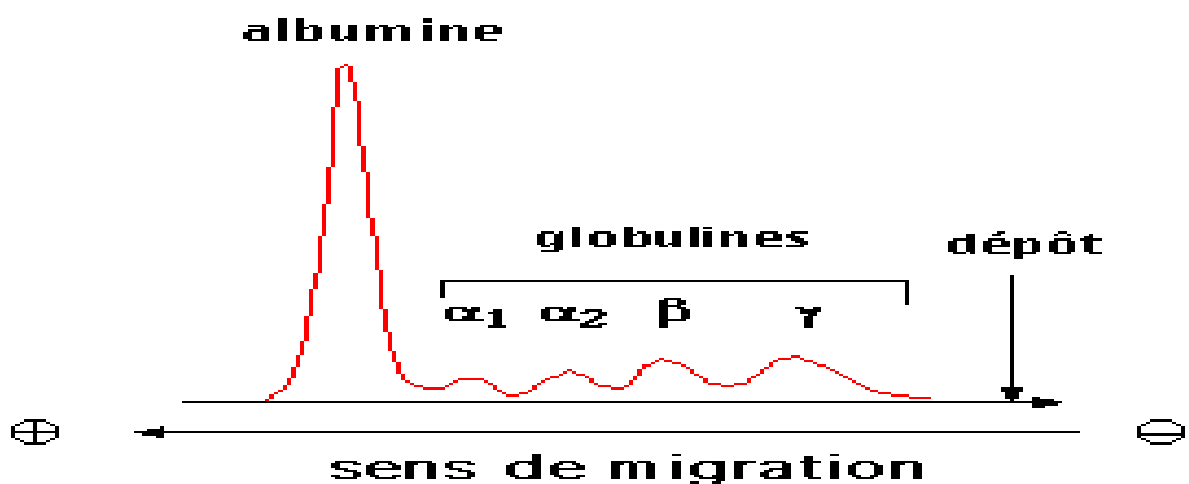


Figure 01 : Electrophorèse des protéines sériques

Les valeurs de référence des différentes fractions de l'électrophorèse sont :

- L'albumine : 33-52 g/l
- α 1 globulines : 1-3 g/l
- α 2 globulines : 3-6 g/l
- β globulines : 6-9 g/l
- γ globulines : 9-14 g/l
- Les protéines constituant les différentes fractions de l'électrophorèse sont :

❖ **L'Albumine** : c'est une protéine synthétisée par les hépatocytes mais on la trouve également dans le lait et le blanc d'œuf sous forme d'ovalbumine. Elle est indispensable à l'organisme et représente jusqu'à 60 % des protéines du plasma. Ses fonctions sont les suivantes :

- Elle maintient la pression oncotique
- Elle transporte les hormones thyroïdiennes
- Elle transporte d'autres hormones liposolubles
- Elle transporte les acides gras libres
- Elle transporte de la bilirubine non conjuguée
- Elle transporte de nombreux médicaments
- Elle transporte du tryptophane
- Elle joue le rôle de tampon (maintien l'équilibre du pH)
- Elle lie le calcium

-Le dosage du taux d'Albumine dans le sang est appelé albuminémie. L'hypo-albuminémie (diminution du taux d'albumine dans le sang) pourrait être dû à une dénutrition, à une insuffisance hépatique ou plus rarement à syndrome hépatique (une maladie rénale responsable de la fuite des protéines dans les urines, maladie de crohn...etc).

L'hyper-albuminémie peut être due par exemple à une déshydratation.

❖ Les $\alpha 1$ globulines

- ✓ **$\alpha 1$ antitrypsine** : c'est la protéine la plus abondante des $\alpha 1$ globulines, elle a pour rôle d'inhiber les élastases (endopeptidases qui clivent les protéines de la matrice extracellulaire. Ce sont des enzymes libérées par les leucocytes en cas d'infection).
- ✓ **Antichymotrypsine** : C'est une protéine inhibitrice de la chymotrypsine qui est une enzyme sécrétée par le pancréas jouant un rôle dans la protéolyse.
- ✓ **Lipoprotéines de haute densité HDL** : ce sont des lipoprotéines responsables du transport du cholestérol vers le foie où il pourra être éliminé, cela permet d'éviter son accumulation dans les vaisseaux sanguins et donc d'éviter les risques d'athérosclérose ; c'est pour cela qu'elles sont qualifiées de bon cholestérol par rapport à l'LDL (lipoprotéines à faible densité) qui sont appelés mauvais cholestérol.
- ✓ **Prothrombine ou facteur II** : c'est une protéine de la coagulation sanguine, c'est le précurseur biologique de la thrombine qui est une sérine protéase c'est-à-dire une enzyme catalysant la transformation du fibrinogène en fibrine qui contribue à la formation des caillots sanguins. C'est un facteur vitamine K dépendant.
- ✓ **L'orosomucoïde** : est une glycoprotéine de la phase aigüe de l'inflammation, elle augmente donc en cas d'inflammation et diminue en cas d'un syndrome hépatique et d'une insuffisance hépatique. C'est un transporteur des composés lipophiles. Elle transporte les médicaments basiques alors que l'albumine transporte les médicaments acides.
- ✓ **Globuline liant la thyroxine (TBG : Thyroxin Binding Protein)** : est une des trois classes de protéines du foie qui transporte les hormones thyroïdiennes dans le sang, les autres étant l'albumine

et la pré- albumine (elle se déplace plus vite que l'albumine en électrophorèse).

❖ Les α_2 Globulines

- ✓ **Céruloplasmine** : cette protéine sérique transporte 90% du cuivre de l'organisme.
- ✓ **Antithrombine ou facteur III** : est une protéine inhibitrice de la coagulation.
- ✓ **Haptoglobine** : est une glycoprotéine ayant la propriété de se lier à l'hémoglobine extracellulaire (en cas de destruction des globules rouges de manière physiologique ou pas). Elle s'élève en cas de réaction inflammatoire.
- ✓ **Choline-ésterase** : est une enzyme qui catalyse la réaction d'hydrolyse d'un ester de choline (exp : acétylcholine qui est un neuromédiateur en choline et acide acétique). En physiologie, cette réaction est nécessaire pour permettre aux récepteurs cholinergiques de revenir à leur état de repos après activation. Une élévation du taux plasmatique de cette enzyme a été observée dans 90% des cas d'infarctus du myocarde.
- ✓ **Plasminogène** : précurseur de la plasmine qui est activé par l'urokinase et l'activateur tissulaire du plasminogène. La plasmine a la propriété de lyser la fibrine afin de dissoudre des caillots sanguins (constitués de fibrine) pour reperméabiliser les vaisseaux sanguins réparés et empêcher la formation de thrombose.
- ✓ **Macroglobuline** : glycoprotéine inhibitrice de protéases. Sa taille importante va permettre (via le dosage) de quantifier une atteinte glomérulaire.
- ✓ **Protéine liant le rétinol** : le rétinol est la forme active de la vitamine A. Il est appelé β – carotène dans le règne animal. Il joue un rôle d'antioxydant.
- ✓ **Protéine liant la vitamine D (DBP : Vitamin D Binding Protein)** : la vitamine D est liposoluble. Elle dérive du cholestérol sous l'action des rayons UVB. Elle intervient dans l'absorption du

calcium et du phosphore par les intestins, ainsi que dans leur réabsorption par les reins sous l'influence de la PTH (Parathormone ou hormone parathyroïdienne).

❖ Les β globulines

- ✓ Les lipoprotéines de basse densité (LDL) : elles transportent le cholestérol libre ou estérifié dans le sang et à travers le corps pour les apporter aux cellules. Les LDL sont produites par le foie à partir des lipoprotéines de très basse densité ou VLDL.
- ✓ Tranférine : sa fonction est le transport du fer de l'intestin vers les réserves hépatiques et vers les réticulocytes (la cellule précédant le stade d'érythrocyte dans l'érythropoïèse).
- ✓ Fibrinogène (Facteur I) : glycoprotéine se transformant en fibrine lors de la coagulation.
- ✓ Globuline liant les stéroïdes sexuels (Sex-Stéroïd- Binding Protein)
- ✓ Transcobalamine : Protéine servant de vecteur de la vitamine B12
- ✓ CRP (Protéine C Réactive) : est une glycoprotéine qui active les défenses immunitaires. C'est un marqueur de l'inflammation aigue.

❖ Les γ globulines

Sont représentées par les anticorps et sont synthétisées par les plasmocytes.

IV.3 Les dosages immunohistochimiques des protéines du sang

La présence des antigènes et leurs anticorps entraîne la formation de combinaisons hautement spécifiques mises à profit pour le dosage quantitatif de chaque protéine.

IV.3.1 Quelques méthodes de dosage immunochimiques

IV.3.1.1 L'immunoprécipitation en milieu liquide

On mélange le sérum avec l'anticorps spécifique, après leur dilution, il en résulte un précipité très léger, qui reste en suspension pendant un certain temps provoquant un trouble dont on peut mesurer l'intensité à l'aide d'un appareil appelé néphélémètre (néphélomètre) ; la solution trouble diffracte une partie de la lumière absorbée. Cette méthode est automatisable. Les appareils récents utilisent parfois un rayon laser fournissant ainsi des résultats précis et sensibles.

-Il existe d'autres méthodes permettant le dosage de très faibles quantités de protéines de l'ordre du picogramme, ce qui n'est pas possible avec la méthode de l'immunoprécipitation. Exp : ELISA et le dosage radioimmunologique.

IV.3.1.2 Le dosage radioimmunologique ou (RIA : Radio Immuno Assays)

C'est une technique qui utilise des composés (marqueurs radioactifs) associés à des anticorps. Le taux des protéines se mesure par le nombre de désintégration par seconde.

IV.3.1.3 ELISA (Enzym Linked Immunosorbent Assay c'est-à-dire dosage immunoenzymatique sur support solide)

Cette technique utilise un ou deux anticorps. L'un des deux est spécifique à l'antigène qu'on veut doser (protéine), tandis que l'autre anticorps réagit aux complexes immuns (Ag-Ac) et est couplé à une enzyme qui va provoquer l'émission d'un signal par la transformation d'un substrat chromogène ou fluorogène. La quantification du signal se fait généralement par spectrophotométrie.