

## LES INTERFERENCES ANALYTIQUES DANS L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DES PROTEINES SERIQUES LIEES A LA CRP : A PROPOS DE 20 CAS

### Auteurs :

Mohammed Yassine Alami <sup>1,\*</sup>, Mohammed Bouizmaoun <sup>1</sup>, Hamza Layat <sup>1</sup>,  
Alae Chakir <sup>2</sup>, Fatima El Boukhrissi<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup> Service de Biochimie-Toxicologie, Hôpital Militaire Moulay Ismail, Meknès, Maroc<sup>2</sup>  
Service de Gasto-Enterologie, Hôpital Militaire Moulay Ismail, Meknès, Maroc <sup>3</sup> Université  
Mohamed Ben Abdellah, faculté de Médecine, de Pharmacie et de Médecine Dentaire, Fès,  
Maroc

\*Auteur correspondant : Mohammed Yassine Alami, Service de Biochimie-Toxicologie,  
Hôpital Militaire Moulay Ismail, Meknès, Maroc

Adresse e-mail de l'auteur correspondant : [medyassinealami673@gmail.com](mailto:medyassinealami673@gmail.com)

### Résumé :

L'électrophorèse capillaire (ECP) est une technique de séparation réalisée sur des liquides biologiques. Sur le sérum, elle permet la séparation des protéines sériques en six fractions. Cependant plusieurs substances peuvent engendrer des interférences analytiques. Il s'agit d'une étude prospective sur une période de trois mois ( du 1<sup>er</sup> Septembre 2024 au 30 Novembre 2024) portée sur 20 prélèvements sanguins qui ont bénéficiés d'une ECP à l'aide de l'appareil Minicap SEBIA au service de biochimie toxicologie de l'hôpital militaire Moulay Ismail (HMMI) de Meknès. Les échantillons inclus dans l'étude sont ceux avec une CRP >200 mg/l. Les tracés concernant les échantillons à CRP >200 mg/l ont présenté une interférence qui se manifeste par une augmentation quantitative et une altération qualitative de la fraction bêta 2. Les résultats de notre étude se concordent avec d'autres études faites qui ont révélé la corrélation respectivement entre le changement de l'allure de la fraction bêta 2 et l'augmentation de la CRP. Elles ont mis le point sur l'intérêt de tenir compte de ces interférences dans l'interprétation des protéinogrammes ; et dans le diagnostic différentiel d'autres pathologies. L'ECP des protéines sériques est une technique d'analyse qui est sujette des interférences qui sans connaissance préalable peuvent rendre l'interprétation difficile ou confondues avec d'autres maladies.

### Mots clés :

Electrophorèse capillaire, interférence, CRP, Fraction Beta 2

## Article

### Introduction

L'électrophorèse est une méthode d'analyse qui repose sur le fait que des particules chargées électriquement se déplacent lorsqu'elles sont soumises à l'action d'un champ électrique. Elle permet donc de séparer les molécules chargées contenues dans un mélange en fonction de leurs caractéristiques physicochimiques propres (point isoélectrique, mobilité électrophorétique, taille, masse) et des caractéristiques du milieu dans lequel se déroule la séparation (solide ou liquide, pH, force ionique, électroendosmose). [1]

Appliquée aux liquides biologiques, l'électrophorèse permet de séparer leurs constituants protéiques en différentes fractions dont les concentrations, exprimées en valeur relative ou absolue après mesure de la concentration protéique totale, peuvent donner lieu à des interprétations cliniques et biologiques [2]. En routine de biologie médicale, cette méthode s'applique au sérum, aux urines et au liquide céphalorachidien (LCR). [3]

Il existe un grand nombre de techniques électrophorétiques mais au laboratoire de biologie médicale il n'en existe que deux qui soient adaptées au fractionnement analytique des protéines sériques : l'électrophorèse sur gel d'agarose et l'électrophorèse en veine liquide au sein d'un capillaire de silice fondue qui tend à remplacer la précédente pour sa résolution et son automatisation complète. [4]

L'électrophorèse capillaire en solution libre représente la forme la plus courante d'électrophorèse capillaire. Les migrations se font simultanément dans des capillaires en silice de 25 µm de diamètre. La technologie permet la séparation de molécules chargées en fonction de leur mobilité électrophorétique dans un tampon de pH donné électrique aboutit à l'individualisation de 5 à 6 fractions de l'anode à la cathode la fraction albumine qui inclut la fraction pré- albumine, puis les fractions des globulines alpha1, alpha2, beta, cette dernière éclatée en beta 1 et beta 2, et enfin Gama. [5]. La température est contrôlée par effet Peltier à 35,5 °C, ce qui évite les problèmes de migration liés à certaines cryoglobulines qui peuvent précipiter à température ambiante. Les molécules sont détectées directement à une longueur d'onde d'absorption spécifique (200 nm). Cette détection directe permet une quantification précise de chaque fraction individualisée.

Quelle que soit donc la technique utilisée, les profils électrophorétiques obtenus sont comparables et les bases physiopathologiques d'interprétation similaires. Comme toute méthode analytique de biologie médicale, l'électrophorèse peut voir son interprétation gênée par des interférences sources potentielles de facteurs confondants. Une interférence peut se définir comme « l'effet d'une substance présente dans l'échantillon qui modifie le résultat de l'analyse » [6] Selon le portail de terminologie multidisciplinaire un facteur confondant ou de confusion « est une variable liée à la maladie ou à un autre événement lié à la santé et qui est susceptible d'induire un biais dans l'analyse du lien » [7]. Appliquée à l'électrophorèse cette définition implique qu'un facteur confondant peut donner lieu à des interprétations erronées. Ces interférences peuvent être en rapport avec un événement préanalytique (hémolyse, lactescence), ou avec des substances issues d'une perturbation du métabolisme du patient (bilirubine, fibrinogène, hyperlipémie, acides biliaires, CRP), ou avec des substances exogènes administrées au patient dans un but thérapeutique (antibiotiques, anticorps monoclonaux, produits de remplissage, immunoglobulines polyvalentes humaines) ou diagnostique (produits de contraste iodés). La présence de ces différentes substances dans le sang circulant du patient va être à l'origine de modifications du profil électrophorétique et constituer de possibles sources de confusion pour le biologiste interpréteur. Bien évidemment, interférences et facteurs confondants vont être rigoureusement dépendants de la méthode de détection des protéines, ce qui va nous amener à les classer en fonction de leur méthode de révélation.

## **Matériels et méthodes**

C'est une étude prospective sur une période de trois mois( du 1<sup>er</sup> Septembre 2024 au 30 Novembre 2024) portée sur 20 prélèvements sanguins faits sur des tubes secs ayant une CRP supérieure à 200 mg/l et qui ont bénéficiés d'une électrophorèse capillaire à l'aide de l'appareil minicap sebia au service de biochimie toxicologie de l'hôpital militaire Moulay Ismail (HMMI) de Meknès .Le système Minicap SEBIA utilise le principe de l'électrophorèse capillaire des protéines en solution libre. Il sert à séparer les molécules chargées en fonction de leur propre mobilité électrophorétique dans un tampon de pH donné et aussi le pH de l'électrolyte d'un flux électroosmotique plus au moins important. Ce système comprend deux capillaires en parallèle ce qui permet deux analyses simultanées. Sur le Minicap SEBIA l'injection de l'échantillon (dilué dans le tampon d'analyse) dans les capillaires est réalisée par aspiration au niveau de

l'anode. Ensuite la séparation est effectuée en appliquant une différence de potentiel de plusieurs milliers de volts aux limites de chaque capillaire. Enfin la détection directe des protéines est faite par spectrophotométrie d'absorption à 200 nm du côté de la cathode. Le tampon utilisé à pH basique permet la migration des fractions protéiques dans le sens suivant : gamma globulines ; beta-2 globulines ; beta-1 globuline ; alpha-2 globulines ; alpha-1 globulines et albumine. Le profil électrophorétique obtenu par l'électrophorèse capillaire est composé de six fractions protéiques [2].

Les différents paramètres biochimiques utilisés dans notre étude sont mesurés sur automate ARCHITECT Ci4100 :

**Taux de protéines (TP) :** Ce paramètre est mesuré sur ARCHITECT Ci4100 par la réaction de Biuret dont le principe est le suivant : En milieu alcalin, les protéines qui possèdent au moins 4 liaisons peptidiques forment avec les ions cuivre II ( $\text{Cu}^{2+}$ ) un complexe bleu-violet dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en protéines. Cette coloration varie également en fonction de la nature des protéines à doser, de l'alcalinité du milieu, de la concentration en sulfate de cuivre et de la température. Un dosage colorimétrique est donc possible à 572 nm. Le réactif de coloration utilisé est le réactif de Gornall, composé de :

- ❖ Sulfate de cuivre, qui donne la coloration bleu du réactif due aux ions cuivre à 3 mmol/L.
- ❖ Solution d'hydroxyde de sodium (soude) à 0,2 mol/L, qui rend le milieu basique.
- ❖ Tartrate double de sodium et de potassium, qui « chélate » (piège) les ions  $\text{Cu}^{2+}$  et évite leur précipitation en milieu alcalin sous forme d'hydroxyde de cuivre  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  insoluble .
- ❖ Iodure de potassium, pour éviter la réduction des ions cuivriques avant le dosage.

Valeurs normales : 64 - 83 g/l

**Protéine C réactive (CRP) :** Ce paramètre est dosé sur ARCHITECT ci4100 par méthode immunoturbidimétrique dont le principe est le suivant : Détermination "au point final" de la concentration de CRP à l'aide de la mesure photométrique du complexe immun obtenu lors de la réaction entre les anticorps anti-CRP et la CRP présent dans l'échantillon puis par changement d'absorbance de l'échantillon à 572 nm. Valeurs normales : 0 - 5 mg/l

## Résultats

Durant cette étude on a récolté 20 échantillons présentant un taux de CRP supérieure à 200 mg/l. Tous les échantillons analysés ont montré une augmentation de la fraction bêta 2 voire dédoublement de son taux. La totalité des tracés obtenus montre une augmentation du pic bêta 2 caractérisé par l'aspect monoclonal la CRP moyenne était de 306 mg/l. Le tableau à la fin du manuscrit présente les taux des CRP des différents échantillons et leurs fractions bêta 2 quantifiées correspondantes en g/l : ( Valeur de référence de la fraction bêta 2 : 2.3 – 4.7 g /l) (Tableau 1)

L'électrophorèse capillaire des protéines sériques réalisée sur les échantillons a donné des profils électrophorétiques caractérisés par un pic d'allure monoclonale dans la fraction bêta 2 avec augmentation voire dédoublement du taux de ces globulines pour une moyenne de 8 en g/l ou 13.2 % avec  $p = 0.09$ .

Les figures à la fin du manuscrit présentent quelques exemples des tracés retrouvés par l'électrophorèse capillaire réalisée sur Minicap SEBIA .(Figures 1,2,3).

## Discussion

Depuis la première électrophorèse des protéines sériques réalisée en 1937 la technique a connu une évolution qui a pu générer plusieurs types selon la nature des champs migratoires (gel d'agarose, gel de polyacrylamide, capillaires de silice). Dans les années 1980, il était possible par plusieurs équipes l'idée de réaliser une électrophorèse dans un tube très fin d'un diamètre  $< 200 \mu\text{m}$  d'où la naissance d'une technique plus performante que les autres précédemment existantes [8]. L'électrophorèse capillaire comme technique d'analyse a permis un gain de rapidité de résolution et d'automatisation. Cette technique permet la séparation des protéines contenues dans un sérum soumis à l'action d'un champ électrique aboutit à l'individualisation de 5 à 6 fractions [5]

La composition globale de chacune des fractions va être indépendante de la méthode, sachant cependant que la mobilité de certaines protéines au sein même d'une fraction donnée peut varier en fonction du support. On va donc pouvoir individualiser de l'anode à la cathode :

-Dans la fraction d'albumine, on trouve l'albumine et si le support le permet, cas de l'électrophorèse en veine liquide au sein d'un capillaire de silice fondue, le complexe transthyrétine-retinol binding protéine ;

- Dans la fraction alpha1, on trouve l'orosomucoïde et l'alpha1 antitrypsine avec orosomucoïde qui migre en avant de l'alpha1 antitrypsine en électrophorèse capillaire des protéines et qui est non visible à l'électrophorèse sur gel d'agarose en raison de son point isoélectrique très acide l'empêchant de fixer les colorants ;

-Dans la fraction alpha2, on trouve l'alpha2 macroglobuline, l'haptoglobine et une très faible concentration d'IgA, en électrophorèse capillaire des protéines l' haptoglobine migre en avant de l'alpha2 macroglobuline et dans l'ordre inverse en l'électrophorèse sur gel d'agarose ;

-Dans la fraction beta, 40 % environ des IgA totales et les pics beta 1 de la transferrine et beta 2 de la protéine C3 et C4 du système du complément. Ces pics sont insérés sur la base de cette fraction dont la hauteur varie en fonction de la concentration en IgA. On y retrouve également environ 5 % des IgM et des IgG, ces dernières étant essentiellement représentées par les IgG2 et les IgG4. La quantification des différentes fractions par mesure de l'absorption à 214 nm permet également de mettre en évidence la lipoprotéine à la jonction des fractions alpha2 et l'hémopexine dans la fraction en arrière de la lipoprotéine et en avant du pic alpha1 ;

-Dans la fraction Gama et sous forme d'un continuum d'allure gaussienne 95 % des IgG et IgM et 60 % des IgA. [5]

Cette technique de séparation est sujette à plusieurs interférences qui influencent le résultat et son interprétation. L'interférence peut être due à un paramètre endogène produit par l'organisme présent dans le sérum comme c'est le cas de la CRP (fait l'objet de notre travail) qui est normalement absente du protéinogramme, peut au cours d'une inflammation aiguë voir sa concentration augmenter de façon considérable, jusqu'à plus de cent fois sa concentration de base qui est inférieure à 5 mg/L. En électrophorèse capillaire, elle se situe à la jonction beta 2 Gama rapide et en l'électrophorèse sur gel d'agarose, elle a une mobilité moyenne. La visibilité de la CRP sur le protéinogramme au cours d'une forte inflammation est un fait à connaître car elle peut être à l'origine d'une confusion avec une Ig monoclonale et, beaucoup plus rarement,

avec un phénotype hétérozygote de la fraction C3 du complément, à ne pas confondre avec un produit de dégradation du C3 [4] sans oublier d'autres paramètres tel que la bilirubine qui se manifeste sur l'électrophorèse capillaire par une bisalbuminémie caractérisé par un dédoublement de pic de la fraction d'albumine ou apparition d'une fraction supplémentaire au côté anodique ou bien à un paramètre exogène administré à des fins thérapeutiques (antibiotique , anticorps monoclonaux) ou diagnostiques comme les produits de contraste qui se manifestent par une augmentation du pic alpha 2 en aspect monoclonal ou un dédoublement du même pic , ce type d'interférences observées avec les produits de contraste peut être confondus avec une immunoglobulinopathie monoclonale de type A quand la fraction alpha2 est modifiée ou bien de type M quand la fraction bêta 2 est altérée . La CRP ou Protéine C réactive a été découverte pour la première fois en 1930 par Tillet et Francis, elle est appelée ainsi, vu sa propriété de précipiter en présence du polysaccharide C du pneumocoque, c'est une bêtaglobuline de 118 kilodalton [9].

La CRP est un bio marqueur de la phase aigüe de l'inflammation « acute phase protéine » qui varie suite à certaines pathologies notamment l'infection, la nécrose tissulaire et le traumatisme, sa présence dans le sang est un signe d'inflammation systémique [10,11].Elle est synthétisée et sécrétée principalement dans les hépatocytes [12] et régulée par l'interleukine-6, l'interleukine-1 et le facteur de nécrose tumorale alpha [13]. Le taux plasmatique normal de CRP dans une population saine sans signe d'inflammation aiguë est inférieur ou égale à 2mgL [10]. Il y a une augmentation rapide de la CRP circulante à partir des niveaux normaux de 1mgL jusqu'à 3000 fois en réponse à une lésion tissulaire aiguë, une inflammation ou une infection, elle diminue ensuite rapidement lorsque la lésion ou l'inflammation se résorbe [14]. Les taux de CRP sont aussi élevés chez les patients souffrant d'hypertension ou après un pontage cardiopulmonaire [15,16] ce qui implique la CRP dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires. Ces différentes situations pathologiques à l' origine de l'augmentation des taux de CRP dans l'organisme nous poussent lors de l'interprétation du protéinogramme de bien savoir le tableau clinique de nos patients pour pouvoir éviter toute investigation complémentaire inutile.

**Etude de l'interférence de la CRP dans l'électrophorèse capillaire :** Dans notre série d'échantillons, la CRP a pu atteindre des concentrations 100 fois son taux de base, ce qui reflète le caractère aigüe de l'inflammation rencontrée chez ces patients prélevés. En électrophorèse

capillaire des protéines sériques, la CRP est toujours absente. Cependant l'augmentation de son taux (100 fois) a permis une visibilité de ce marqueur dans la jonction bêta gamma [2]. Par rapport aux autres protéines de l'inflammation, la CRP a une amplitude de variation très importante comme c'est le cas de notre série, ce qui explique son apparition sur les tracés électrophorétiques rendus par des techniques plus résolutive comme l'électrophorèse capillaire [17]. Nos résultats ont montré des pics en bêta 2 variant de 6.8 à 17% pour une moyenne de 11.8 %, alors que l'intervalle normale était entre 3.2 et 6.5 %. Ce dédoublement dans la fraction protéique bêta 2 se concorde avec l'étude de Cellier et al [2]. Concernant la corrélation entre les valeurs des CRP et les valeurs des pic en bêta 2 quantifiés obtenus on a calculé le p-value on a obtenu une valeur de 0.09. Toute valeur p égale à 0.05 est dite significative, alors qu'une valeur comprise entre 0.05 et 0.1 comme dans le cas de notre série, est considérée comme marginalement significative. L'apparition du pic en bêta 2 crée une confusion avec l'interprétation d'une gammopathie monoclonale par présence des immunoglobulines ou un phénotype hétérozygote de la fraction C3 du complément [18].

## Conclusion

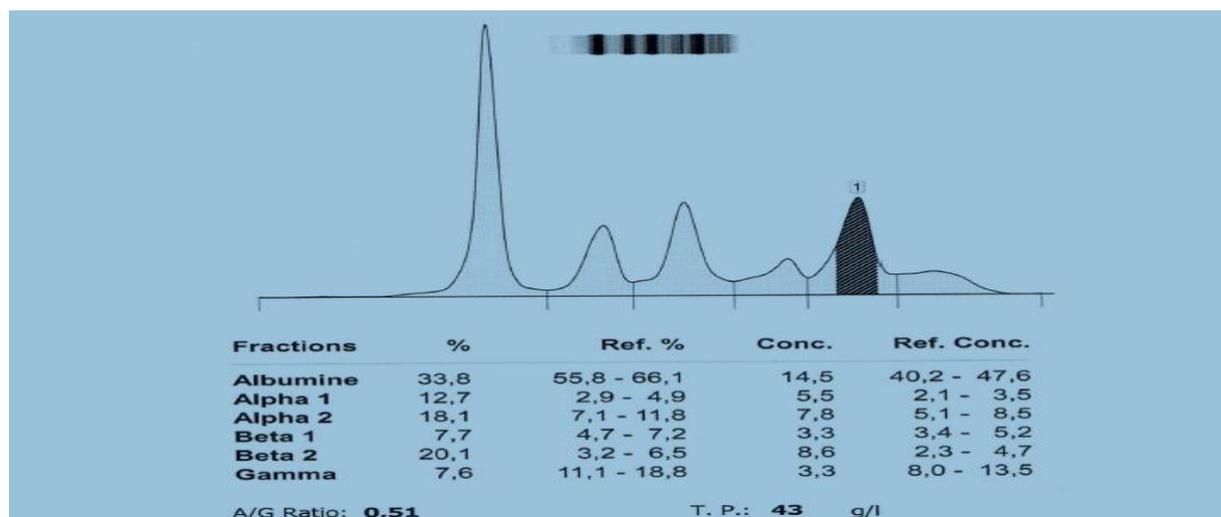
L'électrophorèse s'ajoute aux techniques de séparation des éléments en suspension dans un liquide selon plusieurs critères. L'électrophorèse capillaire des protéines sériques est une technique d'analyse qui repose sur la séparation des molécules selon leurs charges et leurs poids moléculaire sous l'action d'un champ électrique .Elle répond aux contraintes de simplicité de performance et de traçabilité. Cependant elle est sujette de plusieurs interférences analytiques qui peuvent modifier l'aspect du tracé électrophorétique et donc influencer l'interprétation du biologiste. Ce travail a permis d'éclaircir le type d'interférence biologique due à la CRP qui correspond à l'augmentation du pic Bêta 2. Ce type d'anomalie peut être confondu avec d'autres pathologies plus dramatiques comme une gammopathie monoclonale, ce qui nécessite une connaissance préalable par le biologiste pour assurer une bonne interprétation à l'écart des évènements artéfactuels.

Tableau :

Les échantillons	CRP (mg/l)	Fraction beta 2 (g/l)
1	211	7.6
2	224	11.1
3	247	12.6
4	231	10.2
5	316	9.8
6	456	9
7	254	9
8	320	6.6
9	286	5.6
10	414	6.3
11	320	7.4
12	244	9.6
13	506	12.6
14	288	9.4
15	320	6.5
16	367	7.5
17	304	4.4
18	320	8.8
19	265	8.6
20	320	10.5

*Tableau 1 : Tableau des valeurs de CRP et de la fraction bêta 2 des échantillons.*

Figure :



*Figure 1 : Protéinogramme de l'échantillon à CRP=265 mg/l montrant un pic en bêta 2.*



## Remerciements

**Les résultats présentés reflètent les efforts indépendants des auteurs, qui ont conçu, exécuté et interprété l'étude. Tous les résultats et conclusions sont basés uniquement sur l'analyse et l'interprétation des auteurs**

## Références :

[1] B. Lissoir, P. Wallemacq, D. Maisin .

Électrophorèse des protéines sériques : comparaison de la technique en capillaire de zone Capillarys® (Sebia) et de l'électrophorèse en gel d'agarose Hydrasys® (Sebia) . Annales de Biologie Clinique. 2003 ;61(5) :557-562.

[2] Cellier, C. C., Lombard, C., Dimet, I., & Sarda, M. N. K. (2018).

L'électrophorèse des protéines sériques en biologie médicale : interférences et facteurs confondants. Revue francophone des laboratoires, 2018(499), 47-58.

[3] Trivin, F., & Le Bricon, T. (2003).

Nouvelles techniques d'électrophorèse : applications aux protéines et à l'ADN. Immuno-analyse & Biologie spécialisée, 18(1), 11-22.

[4] chohra.y, debiane. M, firoud. D,

les interferences analytiques en Riviere H, et al. electrophorese capillaires des proteines seriques .

[5] Colette Chapuis Cellier\*, Christine Lombard, Isabelle Dimet, Marie-Nathalie Kolopp Sarda,

L'électrophorèse des protéines sériques en biologie médicale : interférences et facteurs confondants, REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES N° 499, FÉVRIER 2018

[6] Kroll MH, Elin RJ.

Interference with clinical laboratory analyses. Clin Chem 1994 ;40(11) : 1996-2005.

[7] Portail de terminologie multidisciplinaire : [www.termsciences.fr](http://www.termsciences.fr)

[8] Trivin, F., & Le Bricon, T. (2003).

Nouvelles techniques d'électrophorèse : applications aux protéines et à l'ADN. Immuno-analyse & Biologie spécialisée, 18(1), 11-22.

[9] BRIAN CLYNE, JONATHAN S. OLSHAKER.

The C – reactive protein. *The Journal of Emergency Medicine* 1999 ; Vol 17, N °6 : 1019-1025.)

[10] Gabay C, Kushner I.

Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999 ;340 :448–454.,

[11]. Prasad K.

C-reactive protein and cardiovascular diseases. *Int J Angiol* 2003 ;12 :1–12

[12] Hurlimann J, Thorbecke GJ, Hochwald GM.

The liver as the site of C-reactive protein formation. *J Exp Med* 1966 ;123 :365–378.

[13] Mackiewicz A, Speroff T, Ganapathi MK, Kushner I.

Effects of cytokine combinations on acute phase protein production in two human hepatoma cell lines. *J Immunol* 1991;146:3032–3037.

[14] Anderson HC, McCarty M.

Determination of C-reactive protein in the blood as a measure of the activity of the disease process in acute rheumatic fever. *Am J Med* 1950;8:445–455.

[15] Bach F, Grundmann U, Bauer M,

al. Modulation of the inflammatory response to cardiopulmonary bypass by dopexamine and epidural anesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002;46:1227–1235.

[16] Rohde LE, Hennekens CH, Ridker PM.

Survey of C-reactive protein and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *Am J Cardiol* 1999;84:1018–1022.

[17] Karfo, R., Benchekroun, L., Zohoun, A., & Chabraoui, L. (2015, July).

Difficultés d'interprétation des gammopathies monoclonales de découverte fortuite: cas d'une gammopathie transitoire au cours d'un syndrome inflammatoire important. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 73, No. 4, pp. 495-497).

[18] Bossuyt X.

Interferences in clinical capillary zone electrophoresis of serum proteins. *Electrophoresis* 2004;25(10-11): 1485-7.