

Ministère de l'Education

Université de Bamako

Faculté de Médecine de Pharmacie
et d'odonto-stomatologie

République du Mali

Un Peuple - Un But – Une Foi

Thèse N°.....
ANNEE 2002-2003

LE PROTIDOGRAMME CHEZ LES DONNEURS DE SANG A BAMAKO

THESE :

Présentée et soutenue publiquement le.....devant la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-stomatologie du Mali par Monsieur

MOUSSA IBRAHIM pour l'obtention du grade de docteur en Pharmacie
(Diplôme d'Etat)

JURY

Président du Jury :

Professeur **MOUSSA HARAMA**

Membres :

Docteur

BAKARY M CISSE

Docteur

SOULEYMANE DIALLO

Directeur de Thèse :

Professeur

ANATOLE TOUNKARA

Sommaire

Pages

Introduction	1
Objectifs	3
Généralités	5
I Rappel sur les protéines.....	6
II Le protidogramme.....	14
III Etude sémiologique du protidogramme.....	20
IV Le protidogramme en milieu tropical et chez l'Européen.....	32
Méthodologie	33
1.Lieu d'étude.....	34
2.Type et période d'étude.....	35
3. Population d'étude.....	35
4.Echantillonnage.....	35
5. Prélèvement du donneur de sang et collecte des échantillons.....	36
6.Techniques d'analyse.....	37
7.La saisie et l'analyse des résultats.....	48
Résultats	49
Commentaires et discussions.....	59
Conclusion et recommandations	64
Bibliographie	67
Annexes	71

FICHE SIGNALITIQUE

Nom : IBRAHIM

Prénom : Moussa

Titre : Le Protidogramme chez les donneurs de Sang à Bamako

Année : 2003

Pays d'origine : MALI

Ville de soutenance : Bamako

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie

Secteur : Transfusion Sanguine

RESUME :

Le Protidogramme est une technique d'analyse souvent employé lors des analyses biologiques. Il permet la séparation des différentes protéines contenus dans le sérum en cinq fractions : Albumine , les Globulines alpha 1, alpha 2, bêta et les gamma globulines.

Cette étude nous a permis de suivre le profil électrophorétique des donneurs volontaires réguliers au CNTS de Bamako, centre de référence pour la Transfusion Sanguine.

C'est une étude prospective entreprise de Janvier 2002 à Octobre 2002 chez 120 donneurs réguliers de Sang.

Elle nous a permis de déterminer les taux moyens des différentes fractions protéine :

58,3% des donneurs ont un taux de protéine total normal avec un taux moyen de 83g/l

61,7% des donneurs ont un taux d'Albumine normal avec un taux moyen de 60% de PT

90 % des donneurs ont un taux d'alpha 1 globuline normal avec un taux moyen de 2,8% de PT.

81,7% des donneurs ont un taux d'alpha 2 globuline normal avec un taux moyen de 8,7% de PT.

83,3% des donneurs ont un taux de bêta globuline normal avec un taux moyen de 10,4% de PT.

41,7% des donneurs ont un taux de gammaglobuline normal avec un taux moyen de 16,8% de PT

La technique de l'immunoélectrophorèse a été mis au point au CNTS.

MOT CLE : Protidogramme

LES ABREVIATIONS

A :Albumine

A/G : rapport albumine/ globulines

Ag-Ac : antigène- anticorps

CNTS : Centre National de Transfusion Sanguine

CPDA : Citrate Phosphate Dextrose Adénine

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

G : **Globulines**

LCR : Liquide Céphalo Rachidien

MD : Millidalton

MGG : May Grunwald Giemsa

PC : Pression Oncotique

PM : Poids Moléculaire

PT : Protéine Totale

SIDA : Syndrome d'Immuno Déficience Acquise

α FP : Alpha Foetoprotéine

α1G : Alpha 1 Globuline

α2G : Alpha 2 Globuline

β G : Bêta Globuline

γG : Gamma globuline

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le donneur de sang est une personne qui vient régulièrement donner du sang dans un centre de transfusion pour secourir son prochain en situation de besoin.

Sa sécurité préoccupe l'établissement de transfusion sanguine au plus haut niveau.

Dans de nombreux pays, il existe des mesures telles que le dosage pré-don de l'hémoglobine, le bilan hématologique complet avant le don de sang et l'examen physique appareil par appareil, pour assurer la sécurité des donneurs.

Si la recherche de maladies infectieuses est considérée comme une mesure de sécurité du receveur de sang, dans certaines situations comme le paludisme, le don de sang pourrait donner lieu à un affaiblissement du donneur pouvant dans ce cas déclarer un paludisme sévère.

Nous savons que le paludisme comme certaines affections endémiques dans notre pays a un faciès épidémiologique particulier avec une saison de haute transmission. Qu'il s'agisse du paludisme ou d'autres pathologies infectieuses, il existe parfois une dysprotéinémie témoin de l'infection et du syndrome inflammatoire. Ces dysprotéinémies peuvent suivre le même faciès épidémiologique que le paludisme ou l'agent infectieux en question. Les protéines sériques jouent des rôles très variés dans l'organisme. Leurs variations quantitatives, isolées ou non, s'observent à des stades précoces de la phase aiguë lors des affections diverses (infectieuses, parasitaires, bactériennes, virales, etc.), d'une réaction immunitaire et de la malnutrition. Ainsi, des études réalisées sur plusieurs populations africaines [13,27] ont montré le déséquilibre protéique du sérum des noirs africains. Ce déséquilibre est caractérisé par une hypoalbuminémie liée à une hypergammaglobulinémie. Les auteurs ont montré que la concentration des gammaglobulines atteint souvent une valeur de 25 à 45% de la protidémie totale.

Chez le donneur de sang est-il possible d'avoir un reflet indirect des variations du contenu plasmatique en protéines ? . Ces variations ont-elles les mêmes caractéristiques de saisonnalité que les affections sévissant selon un mode endémique ? .

L'étude du protidogramme chez le donneur de sang peut-elle apporter une meilleure connaissance de sa situation sanitaire par conséquent une amélioration de sa sécurité ? .

Pour répondre à ces questions il nous a paru opportun d'entreprendre cette étude dont les objectifs sont les suivants :

OBJECTIFS

OBJECTIFS

OBJECTIF GENERAL :

Contribuer à l'amélioration de la sécurité transfusionnelle

OBJECTIFS SPECIFIQUES :

- 1- Réaliser un protidogramme chez le donneur de sang.
- 2- Réaliser un contrôle du taux d'Hb, Ht, et du nombre de GR chez le donneur de sang.
- 3- Analyser les différentes variations des paramètres biologiques.
- 4- Observer les variations de ces paramètres biologiques suivant les saisons.
- 5- Etudier la prévalence de l'infection palustre chez les donneurs de sang examinés.
- 6- Mettre au point la technique de l'immunoélectrophorèse au CNTS.

GENERALITES

GENERALITES

I. Rappel sur les protéines.

1. Définition : [18]

Les protéines sont des grosses molécules non dialysables de masse moléculaire supérieure à 100000 daltones constituées par un enchaînement d'acides aminés dans un ordre spécifique qui est différent d'une protéine à une autre. Ce sont les constituants les plus abondants du plasma et du sérum. Elles sont surtout des glycoprotéines sauf l'albumine, la β_2 micro globuline, la protéine C-reactive.

2. Historique.

Les protéines sont les constituants les plus abondants du plasma et du sérum. Historiquement ont d'abord été étudiées les protéines totales, puis la sérumalbumine et la sérum-globuline qui en ont été séparées.

Quant le poids moléculaire des chaînes polypeptides atteint au moins 10000 (une centaine d'acides aminés), celles-ci acquièrent un ensemble des propriétés physiques qui les distinguent des peptides plus courts. On a à faire à des macromolécules appelées protéines. Cette dénomination proposée par Berzelius [18] au début du XIX^e siècle rappelle la prééminence de ces composés chez les êtres vivants. Les protéines sont en fait présentes dans toutes les cellules, où elles jouent des rôles forts variés sous formes d'éléments de structures, de molécules contractiles, d'enzymes etc.

Bien que leur classification ne soit pas très aisée, on distingue habituellement :

- Les protéines fibreuses, insolubles dans l'eau de poids moléculaire très élevé et mal défini rencontrées dans les tissus de soutien et de protection.
- Les protéines globulaires, parmi lesquelles figurent les protéines douées d'activités biologiques, le plus souvent solubles dans l'eau ou dans les solutions salines diluées, de structure générale sphérique ou ovoïde. C'est dans cette classe que nous retrouvons les protéines du sérum, milieu biologique très complexe provenant de la coagulation du sang extravasé qui renferme une forte quantité de protéines.

Les critères de précipitation par les sels (sulfate d'ammonium) avaient conduit à la distinction entre sérum-albumine et sérum-globuline puis l'affinement des méthodes de séparation révèle l'hétérogénéité du groupe des globulines, qui comporte un nombre considérable d'entités protéiques distinctes, dont la plupart ne sont d'ailleurs pas des holoprotéines, mais des hétéroprotéines telles que les glycoprotéines [19]

Nous examinerons ici les principales de ces protéines, classées d'après leur migration électrophorétique. Leurs rôles biologiques sont très variés et leur dosage dans le sérum revêt une grande importance en chimie clinique où il contribue au diagnostic de nombreuses affections.

-Sérum albumine : elle représente 60% des protéines du sérum

-Sérum globulines : dans ce groupe hétérogène, on rencontre des protéines d'activité biologique fort variée : Transporteur de métaux, hormones, anticorps et enzymes.

☞ **globuline α** : l'électrophorèse permet la distinction entre globuline α_1 qui représente 4% des protéines sériques et globuline α_2 qui représente 7% des protéines sériques

☞ **globuline β** : groupe hétérogène représentant 12% des protéines sériques

☞ **Globulines γ ou immunoglobulines** : ce groupe le moins mobile à l'électrophorèse, représentent environ 17% des protéines sériques, revêt une homogénéité structurale remarquable, une diversité exceptionnelle par le nombre quasi infini d'individualités protéiques qu'on peut y rencontrer.

3. Origine et formation des protéines.

3.1. Origine. L'organisme synthétise lui-même ses protéines sériques. Celles-ci proviennent essentiellement de l'alimentation. Les protéines alimentaires sont successivement dégradées en polypeptides, puis en acides aminés à partir desquels, l'organisme compose ses propres protides. Dans les carences nutritionnelles, l'organisme puise les éléments aminés qui lui sont nécessaires dans ses propres réserves, constituées principalement par les muscles.

Toutes les protéines, qu'elles proviennent de l'alimentation ou des réserves de l'organisme, subissent obligatoirement une série de dégradation et ce n'est que secondairement que s'effectue la synthèse de celles qui sont spécifiques du milieu sanguin.

3.2. Formation. La diversité des protéines implique une spécialisation des organes chargés de leur élaboration. Charnot et ses collaborateurs [6] schématisent simplement le mécanisme de leur formation : sous le contrôle général des glandes endocrines, le foie ferait la synthèse de l'albumine ainsi que du fibrinogène et de la prothrombine qui ne font pas partie des protéines sériques puisqu'on les rencontre

uniquement dans le plasma ; la synthèse des globulines serait effectuée par la synthèse reticulo-endothéliale.

Busson, Trapet, et Lecoq [5] précisent que le foie élabore des protéines peu différenciées que certains éléments du système reticulo-endothélial remanieraient secondairement.

Enfin, Wuhrman et Wunderly [31] soulignent que le foie représente le foyer stratégique du métabolisme des protéines et ainsi a une importance fondamentale pour les protéines sanguines. Selon eux, le foie est le lieu de dégradation des protéines en acides aminés ; c'est le lieu principal de formation et de conservation des différentes protéines du plasma ; enfin il est capable de déverser directement dans le courant sanguin des protéines directement utilisables, tandis que d'autres plus spécialisées ont besoin pour être achevées du concours supplémentaire de certaines cellules du système reticulo-endothélial intra et extrahepatique ainsi que de celles du mésenchyme actif, des plasmocytes et des monocytes.

4. Fonctions physiologiques de l'ensemble des protéines sériques.

La diversité des constituants protéiques du sérum laisse supposer à juste titre que chacun de ses éléments joue un rôle spécifique. Cependant, les principales fonctions physiologiques, dont les protéines sériques sont responsables, sont assurées par toutes les protéines ensemble [26]

4.1. Fonction de transport. Les protéines sont des composés éminemment réactifs et possèdent des fonctions acides, amines, alcools, amides ; elles ont donc une fonction de transport. Certaines enzymes, hormones et métaux sont transportés par des protéines qui peuvent être spécifiquement adaptées à l'une de ces fonctions. De même, des médicaments sont transportés dans le plasma liés à des protéines, en particulier la sérumalbumine.

4.2. Maintien de la stabilité du volume sanguin.

Les protéines du plasma exercent une pression osmotique qui est proportionnelle à la concentration des protéines et inversement proportionnelle à leur masse moléculaire. Au niveau des capillaires, la pression exercée de part et d'autre de la paroi par les sels est à peu près analogue. Par contre les protéines beaucoup plus abondantes dans les vaisseaux exercent une pression dite oncotique.

Les protéines sériques ont donc pour fonction principale de maintenir le volume sanguin en réglant les échanges liquidiens entre le sang et les espaces interstitiels. Cette action est liée à leur propriété de fixer et de retenir l'eau ; il en résulte qu'une

hypoprotéinémie importante se manifeste par la formation d'œdème ; en effet une chute du taux des protéines du sang entraîne une baisse de la pression oncotique qui favorise la fuite liquidienne dans les espaces interstitiels. La participation de l'albumine et des globulines à cette action est cependant inégale : l'albumine retient 2.4 fois plus d'eau que les globulines, c'est la raison pour laquelle le rôle de l'albumine est généralement mis en valeur tandis que celui des globulines est un peu négligé. Pourtant la réalité du rôle des globulines mérite d'être souligné ; ce rôle est en rapport avec l'importance respective de l'action de l'albumine et des globulines sur la pression colloïdo-osmotique. En effet si le volume sanguin était seulement lié à la masse totale des protéines qu'il contient, toute augmentation des protéines totales devrait provoquer une rétention accrue d'eau dans le sang, c'est à dire :

- Une augmentation du volume sanguin
- Une hémodilution

Or dans la réalité, cette hyperprotéinémie ne s'accompagne généralement pas d'une exagération parallèle du volume sanguin. Ce fait implique l'existence d'un mécanisme régulateur. Nous le trouvons dans ce que Wurman et Wunderly [31] appellent le mécanisme de régulation inverse entre l'albumine et les globulines, qui est la manifestation du souci de l'organisme de maintenir la pression osmotique du sang. Ainsi par exemple, une forte augmentation des globulines provoquée par une cause infectieuse est habituellement compensée par une diminution proportionnelle du taux de l'albumine. De même une faible diminution du taux de l'albumine compense l'action exercée par l'augmentation d'une quantité plus élevée de globulines ; ainsi la protéinémie totale est augmentée sans que la pression osmotique du sang soit modifiée. Dans les agammaglobulinémies nous observons le phénomène inverse : la chute des globulines liée à l'absence totale des gammaglobulines correspond aux taux le plus élevé de l'albumine que l'on retrouve en pathologie [10]

Les protéines sériques, albumine et globulines participent donc ensemble au maintien du volume sanguin et à son équilibre avec les liquides interstitiels. Cet équilibre est maintenu par ajustement qualitatif convenable des éléments protéiques entre eux.

4.3. Maintien du PH sanguin.

Les protéines sériques jouent un rôle secondaire dans le maintien du PH du sang à 7,3 -7,4. Elles ne participent que pour 1/13 au pouvoir tampon qui assure cette fonction à côté des trois autres systèmes : acide carbonique/bicarbonate ; .

4.4. Action sur la calcémie sanguine.

Les protéines jouent un double rôle sur la calcémie. Le taux de la calcémie est en effet parallèle à celui de la protéinémie ; il en résulte qu'une hypoprotéinémie, au cours de la néphrose par exemple, entraîne une hypocalcémie

Les protéines agissent en outre sur le taux de calcium sous sa forme ionisée libre, forme qui est seule physiologiquement active. Les protéines ont en effet la propriété de fixer les cations libres du sang, notamment les ions calciums, et il existe une réaction d'équilibre qui en règle la libération.

4.5. Protection contre l'hémolyse.

L'ensemble des protéines joue encore un rôle dans la protection des globules rouges contre les différents agents hémolytiques. Wuhrman et Wunderly [31] ont montré que cette action est liée à la constance de la structure colloïdale des protéines sériques et que la protection exercée par l'albumine est environ dix fois supérieure à celle procurée par les globulines.

Les protéines sériques dont nous venons de passer en revue les principales fonctions ont donc un rôle physiologiquement très important. Elles participent encore à d'autres fonctions : elles contribuent notamment aux phénomènes généraux de détoxication ; elles sont le véhicule des acides gras ; en plus de leur remarquable rôle de transport, d'inhibiteurs de protéases, de défense immunologique (immunoglobulines) etc..... ; ces protéines jouent un rôle dans l'édification incessante de l'organisme par les échanges entre protéines circulantes et protéines fixées.

Rappelons que chaque constituant protidique a des propriétés qui lui sont particulières et qui sont de nature à contribuer à l'équilibre physiologique.

5. Méthodes de dosage de la protéinémie totale. [15]

5.1. Définition : C'est la mesure de l'ensemble des protéines sériques.

5.2.1. Réaction de Biuret.

- **Principe :** En milieu alcalin, les ions cuivriques donnent avec les liaisons peptidiques un complexe de coloration violet-pourpre. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des protéines. Cette coloration est mesurée par spectrophotométrie en lumière visible (colorimétrie).

- **Avantages** : assez spécifique ; peu sensible aux interférences médicamenteuses ; simple ; rapide ; fiable et facilement adaptable à une automatisation.

- **Inconvénient** : peu sensible (donc mal adaptée à la mesure sur micro-prélèvement).

5.2.2. Méthode de Lowry.

-**Principe** : Elle utilise la réaction du Biuret, et lui associe un réactif donnant une coloration avec les noyaux phénols. On dose donc les liaisons peptidiques et la tyrosine des protéines, (d'où la grande sensibilité de la méthode) mais on dose aussi les noyaux des médicaments (d'où la faible spécificité de la méthode).

-**Avantages** : très sensible (donc utilisable pour les micro-prélèvements) ; facilement adaptable à une automatisation.

-**Inconvénient** : peu spécifique

5.2.3. Méthode physique : la réfractométrie

- **Principe** : on mesure l'indice de réfraction du sérum. La mesure se fait à l'aide d'un réfractomètre directement étalonné en concentration protéique. L'indice de réfraction est proportionnel à la concentration des macromolécules dans le sérum. A l'état normal les macromolécules du sérum sont les protéines.

- **Avantages** : méthode simple, rapide, donc utilisable en réanimation.

- **Inconvénients** : non automatisable, sensible à toutes les macromolécules.

Enfin, le dosage des protéines totales du plasma ou du sérum, relativement simple peut donc apporter des renseignements intéressants.

Les valeurs normales chez l'homme sont de 67 ± 3 g/l. Chez le nouveau-né les valeurs sont plus basses (50g/l) et plus dispersées et la valeur adulte n'est atteinte qu'au bout de 6 à 8 mois. [26]

Les hyperprotéinémies sont rares. On les observe dans deux groupes de circonstances :

☞ hémococoncentration par perte d'eau (état de déshydratation), par sudation excessive, diarrhée prolongée ou vomissements répétés par exemple.

☞ Hyperprotéinémie isolée : on rencontre ce symptôme dans le myélome multiple des os et dans les macroglobulinémies.

Quant aux hypoprotéinémies les causes sont nombreuses : hémodilution, défaut de synthèse protéique (du fait par exemple de carences alimentaires très importantes ou d'alimentations déséquilibrées, altération hépatique), augmentation du catabolisme

des protéines, élimination urinaire ou digestive très importante de protéines, des ponctions d'ascite répétées peuvent entraîner une hypoprotéinémie.

6. Fractionnement des protéines sériques.

Le fractionnement est plus ou moins efficace ; on a selon les cas un groupe de protéines ou une protéine isolée. Nous nous intéresseront à cet effet aux fractionnements en chimie clinique qui sont surtout électrophorétiques et immunologiques.

6.1. Méthodes électrophorétiques. Ce sont les plus importantes actuellement. Elles se fondent sur la charge électrique des protéines en solution et sur leur mobilité. Les protéines, substances amphotères, possèdent à la fois des charges positives et négatives et selon le PH de la solution elles se comportent comme possédant soit plus de charges positives, soit plus de charges négatives : la migration des protéines sous l'influence du champ électrique sera donc fonction du PH. A un PH déterminé, des protéines différentes migreront de façon distincte.

On peut citer par exemple : l'électrophorèse à frontière mobile ou première méthode de Tiselius [26] qui fut la première utilisée ; l'électrophorèse de zone (papier ou plus souvent acétate de cellulose, gélose) et l'électrophorèse de zone en gel d'amidon et en gel de polyacrylate

6.2. Méthodes d'immunodiffusion. [26]

6.2.1. Méthode de Oudin ou d'immunodiffusion simple.

On incorpore l'anticorps à la gélose dans un tube ; à la surface on dépose l'antigène, celui-ci diffuse. Le contacte antigène-anticorps s'effectue et une ligne de précipitation s'établit. C'est la première méthode immunologique en milieu solide.

6.2.2. Méthode d'Ouchterlony ou de double diffusion.

On utilise un bloc de gélose dans lequel on perce trois godets. Dans l'un on place une préparation contenant un antisérum et dans les deux autres on place deux antigènes. Les molécules diffusent dans la gélose en fonction de leur taille et forment des lignes de précipitation pour chaque système d'antigène et d'anticorps correspondant à leur zone d'équivalence respective c'est à dire à la formation d'un réseau Ag-Ac.

6.2.3. Méthode d'immunodiffusion radiale ou de Mancini.

La gélose contient l'antisérum ; on dépose dans des godets des quantités variées de protéines antigéniques. On obtient des précipités circulaires dont on mesure la surface qui est proportionnelle à la quantité d'antigène déposée.

6.3. Méthodes d'immunoélectrophorèse.

6.3.1. Définition. L'immunoélectrophorèse est une technique inventée par Grabar et Williams [23] mettant en jeu une séparation électrophoretique des protéines dans un gel d'aga rose suivie d'une double diffusion selon une direction perpendiculaire à l'axe de migration électrophorétique, contre un antisérum. Chaque zone d'équivalence correspondant à un précipité Ag-Ac se traduit par un arc de précipitation. On peut utiliser des antisérums globaux reconnaissant toutes les protéines majeures du sérum ou des antisérums spécifiques.

6.3.2. Principe. Les protéines sériques sont fractionnées par électrophorèse en gel d'agarose, puis un antisérum est déposé dans une rigole parallèle à l'axe de migration. Les protéines diffusent dans le gel à partir de leur zone de migration, les anticorps à partir de la rigole. Des lignes de précipitations se forment au niveau des zones d'équivalence. Selon sa migration, sa concentration et sa diffusion dans la gélose, et bien sûr selon la spécificité de l'antisérum utilisé, chaque protéine donne lieu à un arc de précipitation dont la forme et la position sont caractéristiques.

6.3.3. Intérêt. L'immunoélectrophorèse est une méthode qui permet d'étudier toutes les protéines, une catégorie de protéines ou une protéine particulière, si on utilise respectivement, un antisérum, un anticorps spécifique d'un mélange de protéines ou d'une protéine. Elle est utilisée surtout pour les immunoglobulines. Dans la plus part des syndromes immunoprolifératifs, par exemple, la prolifération cellulaire est monoclonale. Ceci est facilement démontré lorsque le clone secrète une immunoglobuline monoclonale, plus difficile en son absence. Les molécules d'une immunoglobuline monoclonale ont toutes la même structure et leur homogénéité de charge électrique se traduit par une bande étroite à l'électrophorèse (pic) [23]. Cette technique permet donc de caractériser des composants monoclonaux préalablement identifiés sous la forme d'un pic homogène à l'électrophorèse. [15]

6.3.4. Méthode de Williams et Grabar.

C'est une combinaison de l'électrophorèse en gélose ou en agarose, avec une réaction de précipitation spécifique antigène-anticorps : on réalise d'abord une électrophorèse en milieu gélifié, à PH 8,2, sur une plaque recouverte d'un gel

d'agarose ; puis, on dépose dans une gouttière centrale un immunosérum anti-protéines humaines et on laisse diffuser. On observe alors des arcs de précipitation, très nets, correspondant chacun à une fraction protéique particulière.

La migration électrophorétique sépare partiellement les protéines ; le sérum de cheval anti-protéines humaines mis dans la gouttière contient des anticorps spécifiques ; Ceux-ci, mis au contact du même antigène ayant migré par électrophorèse dans le gel, donnent après diffusion un arc local.

6.3.5. Méthode de Laurel.

On dépose différentes dilutions de protéines antigéniques dans des puits creusés dans un gel d'acrylamide-agarose contenant l'antisérum. Le courant électrique est appliqué perpendiculairement à la ligne des godets. Les précipités triangulaires sont proportionnels à la quantité d'antigène.

II. Le protidogramme

1. Rappels historiques. [14]

Tiselius, en 1937, décrit pour la première fois l'électrophorèse en veine liquide. Cette technique, utilisée d'abord pour la séparation des protéines du sérum, se révèle vite trop complexe pour être utilisée en biologie courante.

Aussi, en 1950, W.Grassman et K. Hannig, en utilisant le papier comme support de migration, mettent à la disposition des cliniciens un examen précis, rapide et de faible prix de revient. Dès lors, il y'a eu d'excellentes améliorations concernant les supports de migration à savoir :

- Acétate de cellulose : Brackenriode 1962 ; Maurin et Henry 1970.
- Gel de gélose (Agar) : Wieme 1964 ; Lowenthal 1958-1964 ; Clausen 1962 ; Laterre 1964.
- Gel d'amidon : Manuel 1962 ; Rougement 1962.
- Gel de polyacrylamide : Cunningham 1964 ; Cumines 1970.

Cependant, malgré son faible pouvoir résolutif, l'électrophorèse sur papier continue à être utilisée par de nombreux auteurs, en raison de sa facilité d'emploi et de son faible prix de revient.

2. Technique d'électrophorèse.

Les techniques de fractionnement des protéines sériques sont multiples ; elles sont toutes basées sur les caractères physico-chimiques des protéines, mais chaque méthode met en œuvre une propriété particulière [20, 21]. C'est ainsi que l'électrophorèse de zone étudie, dans des conditions bien définies de PH, de pouvoir

tampon et force ionique, la migration des protides dans un champ électrique ; les autres techniques font appel soit à l'action des sels neutres, soit à l'action des solvants organiques miscibles, soit à l'ultracentrifugation.

Toutes ces méthodes permettent de dissocier les protéines contenues dans un sérum, mais les fractions obtenues par deux techniques différentes ne sont pas toujours superposables. IL en résulte que l'emploi simultané sur un même sérum de toutes les méthodes connues permet de dénombrer actuellement plus de trente constituants normaux [9]. L'électrophorèse effectue un tri entre ces constituants qu'elle groupe en cinq fractions. IL est évident que chaque fraction n'est pas nécessairement pure du point de vue chimique. La méthode employée nous donne une estimation relativement grossière de la composition protéique d'un sérum [5]. Elle est cependant suffisante pour nous permettre d'observer et d'interpréter les modifications physiologiques et pathologiques.

L'électrophorèse est donc une technique d'analyse souvent employée lors des analyses biologiques, nous nous intéressons ici au protidogramme (électrophorèse des protéines sériques).

Les protéines sont des grosses molécules qui peuvent être chargées électriquement. Si on dépose un échantillon de sang sur un gel soumis à un champ électrique, les protéines vont migrer : vers le plus si elles sont chargées négativement, vers le moins si elles sont chargées positivement. Cependant, les protéines vont migrer différemment suivant leur taille et leur charge : plus une protéine est grosse, plus elle va avoir du mal à se faufiler à travers les mailles du gel. De même plus une protéine est chargée, plus elle va migrer rapidement. On peut ainsi séparer les différentes protéines contenues dans un sérum. On obtient un tracé électrophoretique sur lequel apparaissent plusieurs bandes après coloration. Ces bandes correspondent aux différentes fractions protéiques. On fait lire le tracé à une machine qui le converti en une courbe et il est ainsi plus facile de visualiser la quantité et la proportion de telle ou telle protéine.

3. Le protidogramme normal.

IL existe un grand nombre de protéines dans le sérum, si on fait migrer celles-ci dans un champ électrique à travers un gel, elles se distribuent en cinq groupes : albumine, les globulines alpha 1, alpha 2, bêta et les gammaglobulines. La figure1 montre un tracé normal et son intégration (protidogramme) par la machine :

On aperçoit clairement sur le tracé plusieurs bandes plus ou moins foncées ou plus ou moins étalées. A chaque bande correspond une classe de protéines. On fait lire ce tracé à une machine qui l'interprète en affichant le protidogramme montrant très nettement la quantité relative des classes de protéines les unes par rapport aux autres. Le tracé et le protidogramme montrés en exemple sont normaux, l'albumine y est très majoritaire et suivie par les classes de protéines alpha 1, alpha 2, bêta et gamma. [13]

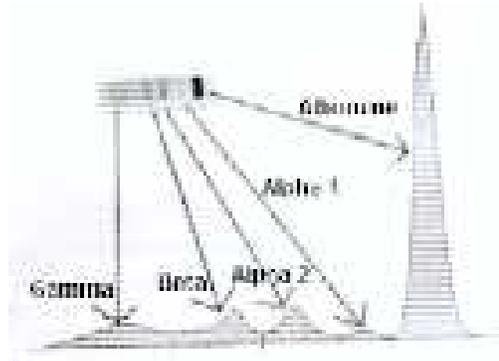


Figure1 : Schéma du protidogramme normal [27]

2

4. Les variations pathologiques du protidogramme.

Le diagramme électrophoretique peut être caractéristique d'un syndrome bien spécifique. En cas de maladie, certaines fractions augmentent, d'autres diminuent, ce qui donne un protidogramme caractéristique. Nous avons les hyperprotéinémies, les hypoprotéinémies et les protéinémies peu modifiées. [3]

4.1. Les hyperprotéinémies.

4.1.1. Hypergammaglobulinémie polyclonale. Elle correspond à une augmentation de toutes les classes d'immunoglobulines suite à une réponse immunitaire [1]

L'albumine, alpha 1, alpha 2, bêta globulines sont normaux.

Etiologie.

- Maladies auto-immunes : lupus érythémateux disséminés, collagénose.
- Maladies infectieuses d'origine bactériennes, fongiques, virales, parasitaires.
- Maladies allergiques : asthme.
- Maladies hépatiques : cirrhose, hépatites.

4.1.2. Hypergammaglobulinémie monoclonale. Elle correspond à la synthèse par un clone de cellules d'un seul type d'immunoglobuline monoclonale [12]. L'albumine, alpha 1, alpha 2 et bêta globulines restent normaux.

Etiologies.

- Myélome multiple des os ou Maladie de Kaler.
- Macroglobulinémie de Waldenström.

4-2- Hypoprotéinémies :

4.2.1. Syndrome de malnutrition ou d'insuffisance hépatique.

Etiologies : dénutrition, insuffisance hépatique, Kwashiorkor

Ce syndrome est caractérisé par une diminution des taux d'albumine et des alpha globulines ; les gammaglobulines sont normales.

4.2.2. Syndrome néphrotique chronique.

Ce syndrome est caractérisé par une diminution des taux d'albumine, d'alpha 1 et de gamma globulines. Les alpha 2 globulines sont par contre élevées.

4.3. Protéinémies peu modifiées.

4.3.1. Syndrome inflammatoire aigu.

- Taux d'albumine normal
- Alpha 1 et alpha 2 globulines augmentées
- Les bêta globulines sont inchangées

Les alpha 1 et alpha 2 appartiennent à la phase aigüe de l'inflammation.[14, 18]

4.3.2. Syndrome inflammatoire chronique.

- Taux d'albumine diminué
- Alpha 1 et alpha 2 globulines augmentées
- Les bêta globulines restent inchangées

Ce syndrome est surtout provoqué par des maladies infectieuses chroniques, allergiques, malignes.

4.3.3. Syndrome cirrhotique décompensé :

- Taux d'albumine diminué
- Les alpha 1 et alpha 2 globulines diminuées
- Les gamma et bêta globulines sont soudées ; caractéristiques des cirrhoses. Cette soudure provient de la synthèse d'une IgA qui à l'électrophorèse se place entre gamma et bêta globulines pour souder les deux.[17]

Voici un tableau qui résume les maladies qui perturbent le protidogramme.

Légende :

N = normal

Les signes « - » sont d'autant plus nombreux que la diminution est accentuée,

Les signes « + » d'autant plus nombreux que l'augmentation est marquée.

Maladie	Alb	Alpha1	Alpha2	Bêta	Gamma
Allergie	N	N	N	N	+
Athérosclérose	N	N	+	++	N
Brûlures 3 ^e degré	--	N	++	N	++
Cancer	--	++	++	++	++
Choc opératoire	-	+	+	N	+
Cirrhose avec ascite	--	-	-	++	+++
Diabète sévère	N	N	N	+	N
Endocardite bactérienne	N	N	N	N	++
Endocardite rhumatismale	N	N	++	N	N
Hépatites infectieuses	-	N	+	N	++
Maladie de Hodgkin	N	N	++	N	+
Hypertension essentielle simple	N	N	N	N	N
Hypertension maligne	-	N	+	++	+
Ictères hémolytiques	N	N	-	-	+
Ictères par hépatite	-	N	N	+	+

Ictères par rétention	-	N	+	+	N
Infarctus du myocarde(2eme au 4eme jour)	N	N	+++	++	+
Kala-Azar	-	N	N	N	++++
Leucémies aiguës	-	N	N	N	+
Leucémie chronique lymphoïde	N	N	N	N	N
Leucémie chronique myéloïde	N	N	N	N	+
Lupus érythémateux	-	N	+	-	++
Mononucléose infectieuse	-	N	+	+	++
Myxœdème	N	N	N	++	+
Néphrite plus néphrose	-	N	++	+	+
Paludisme	N	N	N	N	+
Pneumonie aiguë	N	N	++	N	+
Polyarthrite chronique évolutive	--	+	+	+	+++
Rhumatisme articulaire aigu	-	+	+++	N	+
Syphilis	N	N	+	N	++
Thromboses veineuses	N	N	N	N	++
Thromboses artérielles	N	N	N	+	N
Toxicoses	-	N	+	N	N
Tuberculose aiguë	-	+	+++	-	+
Tuberculose fibreuse	N	N	+	+	++

Tableau I :Les variations du protidogramme dans différentes pathologies humaines [27]

III. Etude sémiologique du protidogramme.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que les protéines exercent ensemble d'importantes fonctions. Chaque élément protidique a en outre un rôle particulier à jouer. L'on sait en effet qu'il existe des affections au cours desquelles la quantité d'un ou plusieurs éléments protidiques varie ; la mise en évidence d'un tel phénomène peut permettre de remonter à la cause et revêt par conséquent un grand intérêt en diagnostic. [9]

1.L'albumine.

-Structure. D'une importante masse (67000 Dalton), il est formé d'une seule chaîne polypeptidique repliée sur elle-même pour former plusieurs boucles maintenues par des ponts disulfures (structure primaire). Dans l'espace, cette structure varie en fonction des substances qu'elle fixe, c'est donc une protéine allostérique dépourvue de glucides [18]. Elle est synthétisée par les cellules hépatiques sous forme d'un précurseur à une plus longue chaîne polypeptidique appelée pré-albumine. Le catabolisme se fait dans la plus part des tissus en particulier lorsqu'ils sont le siège d'une action inflammatoire.

-Rôles de l'albumine : C'est la protéine la plus abondante dans le plasma, elle est entièrement synthétisée au niveau du foie, son taux de renouvellement est de 7p.100 par jours ; sa demi-vie est de 10 à 18 jours. Elle a deux grands rôles :

a. Maintien de la pression osmotique : L'albumine intervient pour plus de 3 /4 dans la pression oncotique du plasma car non seulement elle constitue la protéine la plus abondante (pc est proportionnelle à la concentration) mais aussi la protéine de plus faible poids moléculaire (pc est inversement proportionnelle au PM) ; C'est aussi une protéine très dissociée $PHi = 4.7$ (pc est d'autant plus grande que la protéine est dissociée). L'albumine intervient en retenant l'eau dans les capillaires ; la chute de pression dans les capillaires entraînerait une exsudation d'eau du plasma vers l'interstitium, s'il n'y avait pas d'albumine. Ceci explique l'œdème observé en cas d'hypoalbuminémie [15]. Pourtant, en cas d'analbuminémie, on n'observe presque pas d'œdème, ceci prouve que le rôle de l'albumine dans la pression oncotique, paraît moins capital qu'on ne l'avait cru.[9]

b. Protéine de transport non spécifique : Le transport se fait sur des sites de fixation, le nombre de sites est limité d'où l'existence d'une compétition pour ces sites. Cette compétition existant entre les diverses substances pour les sites de l'albumine est à l'origine de nombreuses interactions médicamenteuses, pouvant provoquer des accidents thérapeutiques [26]. On peut citer entre autre comme substances transportées : les acides gras libres, la bilirubine non conjuguée, les hormones (10% de la thyroxine), les métaux (cuivre et calcium), les médicaments.

-Variations cliniques de l'albuminémie : Le taux normal de séralbumine est de 36 à 50g /l. Si on peut observer une augmentation relative de ce taux par rapport à la diminution des globulines, il n'y a jamais d'augmentation absolue du taux de l'albumine, sauf en cas d'apport de l'albumine par voie veineuse. La seule protéine

plasmatique du fœtus de 6 semaines est l'albumine. A la naissance, elle atteint le taux de l'adulte. En pathologie, on observe surtout des diminutions qui peuvent être dues à une diminution de l'apport alimentaire : malnutrition ; un défaut de digestion : insuffisance pancréatique ; un défaut d'absorption digestive : maladies intestinales ; un défaut de la synthèse de l'albumine, acquise(cirrhose) ou congénital (analbuminémie) ; une augmentation de la perte en albumine par fuite urinaire au cours du syndrome néphrotique, par fuite dans les sérosités des brûlures ou chez certains sujets qui exsudent de l'albumine à l'intérieur de leur tractus digestif (entéropathie exsudative). IL en est de même après un état de choc ou après une irradiation totale par la bombe au cobalt.

IL existe des cas de bisalbuminémies, le plus souvent congénitale, héréditaire, parfois acquise (pénicilline) et bien tolérée où, à côté d'une albumine de mobilité normale et de quantité réduite de moitié, existe une autre albumine soit plus rapide soit plus lente et présente en quantité égale à la première.[26]

Bisalbuminémie secondaire à une pénicillinothérapie : Chez certains sujets, la fixation de pénicilline sur l'albumine est telle qu'elle modifie la migration d'une certaine quantité d'albumine. On observe deux pics : un pic pour l'albumine liée à la pénicilline et un pic pour l'albumine non liée. On pense que ces sujets qui objectivent une bisalbuminémie à la pénicilline, ont réellement une bisalbuminémie familiale, méconnue.[26]

- Bisalbuminémie secondaire à une pancréatite : C'est un phénomène fréquent, mais non constant. La libération anormale, lors des pancréatites, d'enzymes protéolytiques (trypsine) dans le sang circulant provoque le dédoublement de l'albumine par dégradation partielle de la molécule native. On observe deux pics : un pic pour l'albumine complète et un pic pour l'albumine partiellement dégradée.

IL faut dire que l'analbuminémie (absence totale de l'albumine) est compatible avec la vie, mais le sujet présentera des œdèmes chroniques ; c'est le taux de globulines qui va compenser en parti l'absence d'albumine. L'albumine humaine purifiée peut être utilisée pour corriger une baisse du taux de la protéine, surtout quant celle-ci est causée par une baisse de synthèse ou fuite digestive ou urinaire.

2. Les alpha1 globulines.

2.1. Les pré-albumines. Elles comprennent des molécules comme :

- La « thyroxine binding globulin » pour le transport de la thyroxine ;
- La « rétinol binding protéin » pour le transport de la vitamine A ;

- La transcortine pour le transport du cortisol.

Ces trois composés forment un complexe appelé la alpha1 globuline de transport.

2.2. L'alpha foetoprotéine. C'est une glycoprotéine de poids moléculaire 72000. Elle est synthétisée par les hépatocytes chez le nouveau-né, et par le corps jaune pendant la gestation, de même par certaines tumeurs hépatiques ou digestives ; il constitue donc un marqueur de cancer hépatocellulaire et digestive. L'αFP est à un taux maximum de 3mg/ml dans le sérum du fœtus de 13 semaines ; ce taux descend à quelques µg à la naissance, et à quelques ng chez l'adulte. Son taux de référence chez l'adulte est $4,5 \pm 2,6 \mu\text{g/l}$, au delà de $15 \mu\text{g/l}$, ce taux est pathologique. Chez la femme enceinte, le taux sérique normale entre la 15^e et la 30^e semaine est de plusieurs mg/l ; il s'élève en cas de grossesses multiples mais aussi dans 60p.100 des cas d'atteinte du tube neural du fœtus.[26]

La concentration d'αFP s'élève dans diverses circonstances pathologiques :

- Cancer primitif du foie : élévation non constante (2/3 des cas) ;
- Cancer de l'estomac ;
- Tératocarcinome testiculaire : élévation presque constante.
- Hépatites, hépatectomie partielle : rarement ;
- Chez le nouveau-né, qui a un ictère, et où le diagnostic hésite entre une hépatite néonatale et une atrésie des voies biliaires. Le dosage de l'αFP permet de trancher entre une hépatite (αFP élevée car cytolyse) et une atrésie (αFP normale, pas de cytolyse).

La cause la plus importante est le cancer primitif du foie. Son dosage permet de surveiller les gens à risque par exemple les cirrhotiques qui développent souvent des cancers primitifs du foie. [15]

2.3. La glycoprotéine alpha acide : L'orosomucoïde. C'est une petite protéine très acide (pH isoélectrique 3,5), contenant également beaucoup de glucides (41%). Cette acidité est due à sa haute teneur en acide sialique (12%). IL est synthétisé par les cellules hépatiques et joue un rôle antithrombotique, antiprotéasique et immunosuppresseur. Son taux normal compris entre 0,6-1,2g/l peut être pathologique avec une augmentation en cas d'inflammation ou une diminution dans les syndromes néphrotiques et les insuffisances hépatiques. C'est aussi une protéine de la phase aiguë de l'inflammation. Son dosage est effectué essentiellement non pas dans un but diagnostique, mais pour suivre l'évolution d'un processus infectieux, rhumatisme articulaire aiguë par exemple.

2.4. Les alpha1 antiprotéases. Ce sont des glycoprotéines constituées d'une seule chaîne peptidique et contenant 12% de glucides. Elles sont synthétisées par le foie et inhibent toutes les classes des serines protéases de façon irréversible. Le taux normal compris entre 2-4g/l peut soit augmenter en cas d'inflammation, soit subir une diminution d'origine génétique ou acquise.

2.5. Alpha 1 antitrypsine. C'est la principale alpha 1 globuline du sérum et représente les 20p.100 de cette activité. Son déficit est chez l'adulte lié aux broncho-pneumopathies chroniques : c'est un emphysème surtout des bases pulmonaires, commençant plutôt qu'habituellement, frappant plus de femmes qu'il n'est usuel, non précédé de bronchites chroniques préalable et sensible à toutes les causes déclenchant (tabac, poussières). Chez l'enfant l'association se fait avec hépatite ou cirrhose. L'immunodiffusion permet d'en doser $2,12 \pm 0,32$ par litre de plasma. [26]

3. Alpha 2 globulines.

3.1. L'haptoglobine. C'est la glycoprotéine la mieux connue [26]. On a pu la caractériser par sa propriété d'augmenter l'activité pseudo-peroxydasique de l'hémoglobine et a donc la propriété de fixer l'hémoglobine. On peut apprécier l'indice d'haptoglobine en mesurant l'activité peroxydasique du complexe hémoglobine-haptoglobine. Sa structure présente des formes monomères et polymères et contenant 20% de glucides. Elle est synthétisée par le foie, son taux normal 1,5g/l peut augmenter en cas d'inflammation ou diminuer en cas de fuite rénale ou insuffisance de synthèse hépatique. Le dosage de l'haptoglobine au cours des processus inflammatoires et dans les syndromes infectieux est intéressant, non pas dans un but diagnostique, mais pour suivre l'évolution. L'haptoglobine peut diminuer ou même disparaître dans une circonstance très particulière : dans un syndrome d'hémolyse intravasculaire, l'hémoglobine libérée dans ces conditions capte l'haptoglobine.

3.2. La ceruléoplasmine. Cette protéine est aussi synthétisée par le foie, sa structure est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de masse moléculaire 13 MD et contenant 9 % de glucides. Cette structure contient du cuivre, donc capable d'augmenter la quantité du fer dans sa protéine de réserve (apoferritine). Les valeurs normales comprises entre 270 – 500 mg/l peuvent augmenter en cas d'inflammation, de grossesse, de traitement par des oestrogénostatifs. Le taux de ceruléoplasmine est diminué au cours d'une maladie : la cirrhose hépatolenticulaire ou maladie de

Wilson [26]. Elle frappe l'enfant. Par ailleurs, il y a une excrétion surabondante de cuivre par voie urinaire.[26,19]

3.3. Alpha 2 macroglobulines. C'est une grosse protéine de masse moléculaire 750 MD constituée par la réunion de plusieurs sous-unités qui sont très fortement reliées par des ponts disulfures et contenant 10 % de glucides. Elle est fabriquée aussi par le foie et les macrophages et a une action inhibitrice des protéases des collagénoses bactériennes, de même la fibrinolyse ainsi que différentes protéases secrétées par des parasites. Les valeurs normales comprises entre 2,2 - 3,8 g/l sont augmentées en cas d'inflammation aiguë, d'hépatite, d'acromégalie et diminuées en cas d'insuffisance hépatique.

4. Les bêta globulines.

4.1. La transferrine ou sidérophiline. C'est une glycoprotéine de masse moléculaire 90 MD contenant 6 % de glucides et ayant un rôle de transport de fer. La valeur normale comprise entre 2- 4,5 g/l est augmentée chez la femme enceinte et diminuée en cas de syndrome néphrotique. Pour apprécier sa quantité, la manière la plus simple est de mesurer la capacité totale de saturation en fer du sérum. La capacité lente est la différence entre la capacité totale et le taux du fer sérique.

On distingue trois types d'anomalies :

a.Au cours des anémies par carence : capacité totale de saturation en fer de la sidérophiline augmentée et fer sérique diminué.

b.Au cours des anémies hémolytiques : capacité totale de saturation diminuée, fer sérique augmenté.

c.Il est un troisième groupe de circonstance où la capacité lente de saturation est diminuée ou même égale à zéro (toute la sidérophiline est alors saturée) : les cirrhoses bronzées, les hémosidéroses post-transfusionnelles. Le syndrome est celui d'une hypersidérémie et surtout une saturation en fer de toute la sidérophiline.

IL existe des sujets dépourvus de transferrine d'origine génétique et qui ont souvent une anémie hypochrome chronique. [26]

4.2. L'hémopexine.C'est une glycoprotéine de masse moléculaire 70000 contenant 20 % de glucides. Elle est capable de fixer l'hème quant il est séparé de la globine. IL est synthétisé par le foie et dosé dans le sérum par immunodiffusion radiale. Le taux normal compris entre 0,8 –1 g/l peut baisser en cas d'hémolyse intravasculaire, la thalassémie, la drépanocytose, l'anémie pernicieuse et dans les affections rénales.

4.3. La protéine C réactive. Cette protéine est dépourvue de glucides et précipite quand elle est en contact avec le polysaccharide C du pneumocoque d'où son nom [19]. Elle est synthétisée par le foie en faible quantité chez le sujet sain, mais en abondance en cas d'inflammation. C'est donc la première protéine de la phase inflammatoire aiguë à doser qui augmente dans les deux heures qui suivent l'inflammation [8]. C'est un activateur du complément d'où son rôle immunomodulateur portant sur les lymphocytes T. Le taux normal est compris entre 0 –12 mg/l.

4.4. La bêta 2 microglobuline. C'est une protéine de faible poids moléculaire retrouvée non seulement dans le sérum mais aussi dans tous les liquides biologiques (urines, LCR, salive, colostrum). Elle fait parti des protéines de la membrane cellulaire appelées molécules du complexe d'histocompatibilité de classe I et est dépourvue de glucides. Toutes les cellules nucléées synthétisent cette protéine ; elle est donc absente des hématies. Les cellules malignes sont le siège d'une synthèse accrue par rapport aux cellules normales. Elle est surtout dosée par une méthode radio immunologique dans le sérum ; son taux normal est compris entre 0,8 et 2,4 µg/ml. Le dosage s'applique à la fonction rénale et à la cancérologie. En néphrologie une insuffisance glomérulaire s'accompagne d'une élévation de sa concentration, de même que dans certaines maladies dites auto-immunes comme le SIDA, car constitue un facteur prédictif de passage de la séropositivité à la maladie.

5. Les immunoglobulines (gammaglobulines).

5.1. Définition : Immunoglobulines : symbole= Ig ; synonyme= globulines immunes. Nom sous lequel on désigne diverses globulines appartenant au groupe des gammaglobulines, existant dans le sérum sanguin et dans diverses humeurs, douées d'une activité anticorps et possédant des structures biochimiques analogues.[1]

5.2. Les différentes classes d'immunoglobulines.

Les immunoglobulines représentent une classe complexe de glycoprotéines qui constituent pour l'essentiel l'ensemble des gammaglobulines isolables par électrophorèse. Leur importance biologique tient au fait qu'elles sont des anticorps.[2,10]

L'étude de l'hydrolyse partielle par les protéases, la séparation des chaînes par rupture des ponts disulfures avec le mercapto-2 éthanol et la structure primaire des chaînes a conduit aux conclusions suivantes à la suite des travaux où se sont particulièrement illustrés Edelman et Porter [18,22] :

-Les immunoglobulines sont toujours constituées de 4 chaînes identiques deux à deux : deux chaînes légères L(light) et deux chaînes lourdes H(heavy).

Et l'étude de ces chaînes à révéler l'existence de plusieurs types différents.

-Deux types de chaînes légères k (kappa) et lamda,

-Cinq types de chaînes lourdes .

La nature des chaînes lourdes sert à identifier les cinq classes d'immunoglobulines.

5.2.1. Les immunoglobulines G (IgG).Ce sont les mieux connues et les plus importantes sur le plan quantitatif. Le sérum sanguin normal en contient 12 g/l. La demi-vie est environ 20 jours . Les IgG se subdivisent en sous-classe : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 correspondant respectivement à la chaîne lourde $\kappa 1$, $\kappa 2$, $\kappa 3$ et $\kappa 4$.

En dehors de la fixation du complément, seules les IgG franchissent la barrière placentaire par un processus actif [18]. Toutefois la sous-classe IgG2 ne la traverse pas.

5.2.2. Les immunoglobulines M (Ig M). Leur taux normal dans le sérum sanguin est compris entre 0,5 et 2 g/l. La demi-vie est de 3 à 5 jours. Elles apparaissent et disparaissent précocement lors de la stimulation antigénique et fixent bien le complément. A cause de leur valence élevée, elles sont très agglutinantes et précipitent bien.

5.2.3. Les immunoglobulines A (Ig A).Le sérum normal en contient de 1,5 à 4g/l. On en trouve d'ailleurs dans d'autres liquides biologiques(lait, colostrum, salive, etc.). Contrairement aux classes précédentes, les IgA ne fixent pas le complément par la voie classique. Elles ne sont le plus souvent, ni agglutinantes, ni précipitantes. Les IgA seraient plus particulièrement spécifiques des virus. Elles apparaissent régulièrement dans les immunosérums antiprotéiques et sont responsables de l'aspect particulier de certaines courbes de précipitation quantitative.[17]

5.2.4. Les immunoglobulines E (Ig E). Les IgE ne fixent pas le complément et ne traversent pas le placenta. Par contre, elles se fixent solidement mais passivement au niveau des mastocytes de la peau et des basophiles du sang par le fragment Fc. Les IgE joueraient un rôle dans la protection contre les parasites.

5.2.5. Les immunoglobulines D(Ig D). Elles sont présentes en faible quantité dans le sérum (0,3 g/l) et très peu de données existent encore sur leur rôle et leur structure. A l'heure actuelle, on ne leur connaît pas d'activité anticorps, ni effectrices particulières. On les retrouve comme récepteurs cellulaires à la surface des lymphocytes. [22]

5.3. Pathologies des immunoglobulines.

Les tumeurs, les aplasies du système lymphoïde, les maladies parasitaires, hépatites, les déficits immunitaires etc.... perturbent très souvent, dans des sens différents et de façon très importante, la synthèse des immunoglobulines.[1]

Parmi les immunoglobulinopathies on peut distinguer :

- Les hyperimmunoglobulinopathies de type monoclonale ;
- Les hyperimmunoglobulinopathies non monoclonale ;
- Les hypoimmunoglobulinopathies ou déficits immunitaires.

5.3.1. Augmentation d'immunoglobulines monoclonale. C'est une anomalie caractérisée par la présence dans le sérum ou les urines d'un individu d'une très grande quantité d'un type d'immunoglobuline particulière, élaborée par un seul clone cellulaire. Signalons d'emblée que seul le caractère homogène est pathologique : c'est à dire la présence d'un seul type de chaîne H et seul type de chaîne L.

Cette homogénéité structurale se traduit par une identité de charge électrique de toutes les molécules d'Ig monoclonales d'où l'apparition d'une bande étroite (d'un seul pic) en électrophorèse. Ce pic électrophorétique contraste avec le caractère diffus et homogène des Ig monoclonales. L'analyse immuno-électrophorétique permet de typer les Ig monoclonales (en classe et sou-classe de chaîne H, ainsi que du type de chaîne L) et de prouver son homogénéité grâce aux antisérums. En plus de cette hyperproduction d'un type déterminé d'Ig, il y a en même temps diminution de synthèse des autres types d'Ig. [1,12]

5.3.1.1. Myélomes multiples (Maladie de Kaler).

La maladie de Kaler [1] ou myélome multiple est caractérisée par de très nombreuses tumeurs malignes se développant aux dépens des tissus. Ces tumeurs provoquent des douleurs osseuses et des fractures spontanées.

L'immuno-électrophorèse permet de déterminer la classe d'Ig touchée. Le plus souvent ce sont les IgG, puis viennent les IgA. Les Ig D et les Ig E sont légèrement touchées. Les IgM sont très exceptionnellement touchées.

5-3-1-2-La macroglobulinémie de Waldenstrom :

La maladie de Waldenstrom [1] consiste en la prolifération de cellules lymphoplasmocytaires et en l'élaboration par ces cellules d'une IgM monoclonale. L'envahissement se fait essentiellement dans le ganglion, la rate et le foie. La maladie touche des personnes âgées de plus de 50 ans et s'observe dans les deux sexes. A l'électrophorèse on note une augmentation très nette des IgM avec une

bande très homogène. Le diagnostic positif ne peut être confirmé que par une étude immuno-électrophorétique avec un immun-sérum trispécifique (anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM) et surtout monospécifique (anti- κ M). Le dosage immunologique des IgM est également très important.

5.3.1.3. Leucémie lymphoïde chronique(L L C).

C'est une leucémie caractérisée, en particulier, par une hypertrophie des ganglions lymphatiques avec prolifération monoclonale de lymphocytes B. C'est alors au niveau des cellules que l'on retrouve l'Ig monoclonale habituellement absente du sérum. Cette prolifération lymphocytaire, synthétisant des Ig de surface d'une seule classe et sous-classe de chaîne lourde, a un profond retentissement sur l'état immunitaire des malades qui présentent des déficits immunitaires et de fréquentes manifestations auto-immuns. Dans la majorité des cas, l'Ig de surface, mise en évidence par fluorescence, est absente du sérum. On pense que les lymphocytes sont bloqués dans leur différenciation et incapables d'effectuer leur maturation normale vers le plasmocyte.[24]

Dans certains cas de L L C où l'on retrouve une Ig monoclonale dans le sérum, c'est le plus souvent une IgM monoclonale, mais en quantité minime. Dans ces cas les lymphocytes présentent une certaine différenciation vers les plasmocytes.[1]

5.3.2. Augmentation non monoclonale des immunoglobulines :

5.3.2.1. Les infections parasitaires.

a. trypanosomiase : L'augmentation des IgM dans la trypanosomiase est importante. Elle est associée à une augmentation des IgG, par contre le taux des IgA reste normal.

b. Paludisme : Dans le paludisme on note une augmentation du taux des IgA et des IgM.

c. Leishmanioses : Dans les leishmanioses et surtout dans le Kala-azar on note une élévation du taux des IgG.

5.3.2.2. Les cirrhoses. Dans les cirrhoses on note une augmentation des IgA, IgG et les IgM. En électrophorèse, on observe généralement une hypergammaglobulinémie particulière se traduisant par une soudure des fractions α_2 et α_1 -globulinique. [1]

5.3.2.3. Les infections subaiguës et chroniques.

-Infections bactériennes : Staphylococcies, streptococcies, tuberculose, syphilis, endocardite bactérienne subaiguë etc..

-Infections à virus : Mononucléose infectieuse, hépatite infectieuse etc....

-Maladies du collagène comme la polyarthrite chronique.

5.3.3. Déficits immunitaires.

Ces déficits immunitaires peuvent être primitifs ou secondaires. Leur étude est complexe, en effet, certains désordres sont héréditaires, mais beaucoup sont acquis [8]. De plus, l'existence de deux populations de lymphocytes T et B, a sérieusement modifié les données du problème. Les lymphocytes T sont responsables de l'immunité cellulaire et ne sont pas directement impliqués dans la synthèse des immunoglobulines ; toutes fois, il existe une coopération évidente entre lymphocyte T et B.[17]

5.3.3.1. Déficits immunitaires primitifs.

Ces déficits en gammaglobulines sont ordinairement d'origine génétique, ils s'accompagnent d'une réduction très marquée du nombre des plasmocytes et d'une grande sensibilité aux infections bactériennes. Les sujets qui en sont atteints ne synthétisent presque pas d'anticorps circulants.

5.3.3.1.1. Déficit de l'immunité humorale seule (Maladie de Bruton) [1]. C'est l'agammaglobulinémie congénitale, dont les premiers symptômes apparaissent à l'âge de 6 mois. Jusqu'à cet âge l'enfant est protégé par les anticorps maternels (IgG). C'est une affection congénitale à transmission récessive liée au sexe, observée chez les garçons. L'enfant présente ces infections graves avec les germes banaux : pneumopathies, otites, méningites ; etc.....

On constate sur le plan biochimique une baisse ou une diminution très forte des trois types d'immunoglobulines. Au niveau cellulaire, les lymphocytes sont normaux alors que les plasmocytes font défaut dans le sang, la moelle et les ganglions. Le pronostic est très sévère.

5.3.3.1.2. Déficit de l'immunité cellulaire (agammaglobulinémie de type Suisse)[11] :

Le tableau clinique est très précoce : troubles de la croissance, colite ulcéreuse, malabsorption, infections récidivantes(viroses, candidoses), lymphopénie(<100/mm³) Le thymus n'est plus normal, mais atrophié et la mort survient avant l'âge de 18 ans. Le dosage des gammaglobulines montre un taux très bas. A l'immunoélectrophorèse on constate l'absence des IgM et des IgA ou seulement des IgM.

5.3.3.2. Déficits immunitaires secondaires.

Ces déficits peuvent être dus à des causes très variées :

5.3.3.2.1. Catabolisme exagéré des immunoglobulines.

Ce phénomène s'observe dans les affections fiévreuses, au cours de certaines maladies comme les syndromes néphrotiques, les entéropathies de l'enfant, mais également dans les carences protidiques sévères pendant les premières années de la vie.

5.3.3.2.2. Déperdition périphérique.

L'hypoglobulinémie globale et l'hypogammaglobulinémie peuvent s'observer au cours des dermatoses exfoliatrices généralisées, des brûlures étendues, des eczémas, etc. Il faut également noter qu'au cours de la néphrose lipoïdique, l'élimination urinaire massive des gammaglobulines entraîne un épuisement considérable de la réserve protéique.

5.3.3.2.3. Secondaire à des proliférations tumorales touchant les centres médullaires et lymphoïdes. Il peut s'agir de la leucémie lymphoïde chronique, du myélome où, à côté d'une immunoglobuline monoclonale très abondante, les immunoglobulines physiologiques sont fortement déprimées.[1]

IV-Le protidogramme en milieu tropical et chez l'Européen :

Les pays sub-tropicaux et tropicaux sont en effet un foyer fertile d'endémies tant parasitaires que microbiennes ou virales. On peut encore faire un rapprochement entre l'hypergammaglobulinémie qui semble caractériser l'Africain et entre l'augmentation de la fraction gamma au cours des infections chroniques.

Les infestations parasitoses les plus couramment observées en Afrique sont, le paludisme, la trypanosomiase, la bilharziose, l'ankylostomose, l'anguillulose [9]. Ces parasitoses ont un retentissement certain sur la pathologie tropicale et plus précisément en hématologie. Boiron [4] a observé des troubles de la protéinémie dans la population de l'Est de la Mauritanie ; Ces populations ne se distinguent que par leur absence d'hygiène de celle de l'Ouest dont la protéinémie est en revanche normale.

Tableau II : Protéinémie des Européens en pays tempérés et en Afrique

En g/100ml sérum	PT.	A.	G.	α 1-G	α 2-G	β -G	γ -G	A/G
Européens en Pays tempérés [28]	7,03	3,83	3,17	0,29	0,59	0,88	1,41	1,20
Européens en Afrique [6]	7,86	5,06	2,80	0,29	0,57	0,59	1,35	1,80

Tableau III :protéinémie des Africains obtenues en diverses régions d'Afrique par des auteurs utilisant des méthodes différentes.

En g/100ml sérum	P.T.	A.	G.	α 1-G	α 2-G	β -G	γ -G	A/G
Charmot [6]	8,71	3,96	4,75	0,52	0,60	1,39	2,24	0,83
Boiron [4]	7,62	3,81	3,81	0,41	0,76	0,88	1,75	1,00

METHODOLOGIE

METHODOLOGIE

1.Lieu d'étude

L'étude s'est déroulée au Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS) de Bamako, structure nationale de référence en matière de transfusion sanguine.

1.1Création et mission du CNTS.

Le CNTS a été créé par l'ordonnance N°00041/P-RM du 20 septembre 2000. Bien avant cette date, il existait déjà en août 1960 la Banque de sang de l'hôpital du Point-G, puis le 16 décembre 1964 nous assistons à l'inauguration de la Banque Nationale de sang, et, enfin le

5 janvier 1990 par ordonnance N°90-38/P-RM à la création du Centre National de Transfusion Sanguine.

Le CNTS a pour mission de collecter, analyser, préparer, conditionner et conserver le sang humain et ses dérivés en vue de leur distribution aux établissements publics et privés agréés ainsi qu'aux particuliers.

Ace titre, il est chargé de :

- ☞ Sensibiliser, recruter et fidéliser les donneurs ;
- ☞ Effectuer des analyses biomédicales et des expertises médico-légales ;
- ☞ Réaliser des études et des recherches dans le domaine de sa compétence ;
- ☞ Participer à la formation universitaire des étudiants et stagiaires ,ainsi qu'à la formation continue des cadres.

1.1. Organisation et fonctionnement du CNTS.

Le CNTS est animé par un personnel constitué essentiellement :

- ☞ d'un directeur, spécialiste en Immuno-hématologie et en transfusion sanguine, chargé de la coordination de toutes les activités du centre ;
- ☞ d'un pharmacien, responsable de l'assurance qualité ;
- ☞ De trois médecins, l'un, adjoint du directeur et responsable du laboratoire et les deux autres, responsable de la collecte ;
- ☞ de trois techniciens supérieurs de santé, cinq techniciens de santé, affectés aux analyses biologiques.
- ☞ De deux gestionnaires, d'un comptable et de trois secrétaires de direction ;
- ☞ D'une cuisinière ;
- ☞ D'un manœuvre et de deux gardiens

1.3. Situation géographique du CNTS.

Le CNTS est situé en commune II dans le quartier de Quinzambougou au centre ville de Bamako. L'accès aux donneurs se trouve ainsi facilité. Egalement, il est proche des hôpitaux nationaux et autres centres utilisateurs de sang.

2. Type et période d'étude.

C'est une étude prospective qui s'est déroulée au centre national de transfusion sanguine de Bamako, de janvier 2002 à octobre 2002.

3. Population d'étude.

Notre étude a porté sur des donneurs réguliers de sang avertis et renseignés sur l'étude et, ayant donné leur consentement éclairé de participation à l'étude. Il s'agit en fait de donneurs réguliers volontaires de sang ayant un nombre de don de sang supérieur ou égal à trois.

4. Echantillonnage.

Notre échantillonnage a concerné les donneurs de sang réguliers et volontaires en utilisant une méthode aléatoire de sélection. Pour remplir la fiche d'enquête, nous avons clairement expliqué à chaque donneur nos objectifs. Nous avons ainsi après l'adhésion volontaire de chaque donneur, constitué notre échantillonnage au deux saisons concernées de la même année de l'étude à savoir : La saison sèche et pluvieuse.

4.1. critères d'inclusion.

- Etre donneur régulier de sang ayant un nombre de don supérieur ou égal à trois.
- Avoir donné son consentement éclairé de participation à l'étude.

4.2. Critères de non-inclusionn.

Ce sont les critères d'exclusions pour le don de sang a savoir :

- Etre âgé de moins de 18 ans et de plus de 60 ans ;
- Avoir un poids inférieur à 55 kg ;
- Etre une femme en période d'allaitement ou de règle ;
- Appartenir à un groupe à risque transfusionnel du VIH, de la syphilis ou de l'hépatite.

4.3 La taille de nos échantillons.

La taille de nos échantillons n'est pas déterminée à l'avance, elle sera fonction du nombre de donneurs consentants obtenus durant les deux saisons de l'étude et de la disponibilité de nos réactifs. Les donneurs sont choisis au hasard chaque trimestre, vingt donneurs en moyenne étaient retenus par mois. Au terme de notre étude, nous

avons recensé 120 donneurs, en raison de 60 donneurs par saison (sèche et pluvieuse).

5. Prélèvement du donneur de sang et collecte des échantillons.

5.1. Technique de prélèvement du donneur de sang.

Lorsque nous recevons un donneur de sang dans la salle de prélèvement après son entretien avec le médecin de la collecte, nous commençons par l'installer, puis nous attachons un garrot sur son bras. Après avoir désinfecter le pli du coude, nous piquons une grosse veine à ce niveau.

Ensuite nous surveillons l'écoulement du sang dans la poche et le donneur jusqu'au remplissage de la poche. Une fois la poche remplie (sang au niveau supérieur de l'étiquette de la poche), nous pinçons la tubulure puis nous retirons l'aiguille ; par la suite nous sellons la tubulure en trois nœuds et nous la sectionnons en aval du 3^{em} nœuds.

Enfin nous transvasons le sang contenu dans la tubulure dans des tubes à hémolyse et nous numérotions les tubes, les bulletins du donneur et la poche de sang.

5.2. Matériels et réactifs pour le prélèvement du donneur de sang.

Pour le prélèvement du donneur de sang, nous disposons :

- D'un local bien aéré, ventilé ou climatisé ;
- De fauteuils dépliant ;
- D'un plateau de prélèvement ; d'un garrot ;
- De poches en plastiques simples ou doubles contenant un anticoagulant CPDA reliées à une tubulure se terminant par une aiguille ;
- De tubes à hémolyse , d'un portoir, d'un anticoagulant, d'un feutre ; De ciseaux ; du coton ; de l'alcool ; d'un flacon d'eau de javel.

5.3. Collecte des échantillons de sang.

Nous disposons dans la salle de prélèvement de deux séries de tubes à hémolyse pour la collecte des échantillons de sang :

- Une série constituée de tubes secs destinés au protidogramme(électrophorèse des protéines sériques)
- L 'autre série constituée de tubes avec anticoagulant (EDTA) est destinée à l'hémogramme (taux de GR , Hb,Ht) et la goutte épaisse plus frottis. Ces analyses sont effectuées le même jour du prélèvement. Quant au protidogramme, l'analyse se fait sur le sérum. Les sérums sont obtenus après centrifugation du sang total et conservés dans des tubes nuncs comme suit :

- Les sérums sont conservés une semaine au réfrigérateur entre 2-8 °C
- Pour des conservations prolongées, les sérums sont congelés et sont stables au minimum un mois.

6. Techniques d'analyse

6.1. Réalisation du protidogramme

6.1.1. Dosage de la protéinémie totale.

Nous avons utilisé la méthode colorimétrique dite de Biuret (sel de cuivre en milieu alcalin).

- Réactifs.

R1 : albumine bovin

R2 : réactif alcalin constitué de : tartrate de sodium et de potassium(9g /l) ; hydroxyde de sodium(0,2 mol/l) ; iodure de potassium(5g/l).

R3 : réactif de coloration, sulfate de cuivre(150g/l).

- **Principe.** En milieu alcalin, nous avons des ions cuivriques qui se combinent aux liaisons peptidiques des protéines à doser pour donner un complexe violet pourpre. Toutes les substances ayant au moins trois liaisons peptidiques voisines donnent une réaction positive de Biuret.

- **Mode opératoire.** La solution de travail a été préparée en ajoutant 5 ml du réactif R3 à un flacon du réactif R2 . Après mélange, la solution est prête à l'emploi. La stabilité est de six mois entre 2° et 8°.

	Cuve de blanc réactif	Cuve d'étalonnage	Cuve de dosage
Solution de travail	1ml	1ml	1ml
étalon		20µl	
Sérum(échantillon)			20µl

Mélanger et attendre 5 minutes, faire la lecture au programme 20 à l'aide du spectrophotomètre et à une densité optique égale à 550 nm. La stabilité de la réaction est de 30minutes.

La valeur normale dans le sérum est comprise entre 60- 80g/l.

6.1.2. Électrophorèse des protéines sériques.

Principe. Le principe de l'électrophorèse des protéines sériques est basé sur la séparation des protéines en tampon alcalin (pH 8,5) par un champ électrique sur un

support solide. L'agarose a été choisie comme support, il donne une séparation des constituants sériques humaines en six fractions majeurs de mobilité différentes, à savoir : Albumine, alpha1 globuline, alpha2 globuline, beta1- globuline, beta2 globuline, et gammaglobuline.

Nous avons utilisé la technique HYDRAGEL PROTEIN (E) K20. Chaque gel d'agarose contenu dans le kit HYDRAGEL PROTEIN(E) K20 est prévu pour l'analyse de 7 échantillons.

Matériels.

- Générateur de courant ;
- Cuve d'électrophorèse ;
- Pipette de 10ul, 200ul, 1ml ;
- Bacs de fixation, de coloration, de décoloration ;
- Applicateur hydragel K20 SEBIA, contenant le porte –applicateur HYDRAGEL K20
- Etuve universelle ;
- Densitomètre,
- Incubateur-sécheur.

Réactifs. L'électrophorèse sur gel d'agarose des protéines sériques a été réalisée grâce à l'utilisation du KIT HYDRAGEL PROTEINE K20 qui fournit tout le réactif nécessaire, à savoir :

- Gel d'agarose prêt à l'emploi ;
- Tampon tri-barbital en solution concentrée ;
- Colorant d'amidoschwaz en solution concentrée ;
- Décolorant en solution concentrée ;
- Applicateurs sept dents prêts à l'emploi ;
- Papiers filtres fins ;
- Autre nécessaire mais non fourni : eau distillée.

Mode opératoire.

Préparation de la solution tampon : la cuve K20 est constituée de deux compartiments pouvant contenir chacun 150ml de solution tampon. Ceci étant, 30ml de tris-barbital sont complétés à 300ml avec de l'eau distillée et partagés entre les deux compartiments de la cuve K20 de façon équitable.

I. Migration.

- Poser le porte-applicateur HYDRAGEL K20 à plat sur la paillasse et relever le chariot porte-applicateur.

- Déposer 120µl d'eau distillée sur le plateau du porte-applicateur dans le tiers inférieur du cadre sérigraphié.
- Sortir le gel de son emballage.
- Eliminer rapidement l'excès de liquide en surface, en effleurant le gel avec un papier-filtre fin.
- Placer le gel (face orientée vers le haut) sur le plateau du porte-applicateur contre la barrette, à l'intérieur du cadre sérigraphié.
- Abaisser le chariot porte-applicateur jusqu'en position intermédiaire.
- Poser un applicateur à plat sur la paillasse, numérotations (puits) vers le haut.
- Déposer 10 µl de sérum dans chaque puits. Le chargement de l'applicateur ne doit pas excéder 2 minutes et doit être utilisé immédiatement après le chargement.
- Eliminer la protection des dents de l'applicateur et le placer en position n°5 sur le porte-applicateur, enfin abaisser le chariot porte-applicateur jusqu'en butée à l'aide de la manette pour amener l'applicateur au contact du gel.
- Après 40 secondes d'application, tourner la manette du porte-applicateur pour relever l'applicateur et le jeter.
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse, selon la polarité indiquée sur le gel, bas du gel côté cathodique. Le gel est plongé dans le tampon (face orientée vers le bas) sur une distance de 1cm de chaque côté.
- Brancher la cuve au générateur. Les conditions de migrations sont les suivantes

Volume de tampon par compartiment.	150ml
Volume total de tampon	300ml
Temps de migration	30 minutes
Voltage constant	90v
Ampérage de départ (par gel)	12 mA

- Après migration, débrancher la cuve et sortir le gel.

II. Fixation- coloration- décoloration du gel.

Nous avons adopté la fixation à la chaleur. Le gel est séché sous air chaud à 80 °c dans l'incubateur-sécheur jusqu'à séchage complet pendant au mois 10 minutes. Il est très important que le gel soit parfaitement sec.

Pour la coloration, le gel sec et refroidi est d'abord immergé dans la solution de coloration pendant 4 minutes, puis dans deux bains successifs de solution de décoloration jusqu'à obtention d'un fond parfaitement clair. Le gel est ensuite séché dans une étuve.

III. Lecture – résultats.

Le gel ainsi préparé est prêt pour une lecture à 570nm par densitométrie permettant de définir les concentrations relatives (pourcentages) de chaque fraction.

Les valeurs normales pour chaque fraction dans la technique HYDRAGEL PROTEIN(E) K20, ont été établies à partir d'une population de 90 adultes (hommes et femmes), en bonne santé.

Albumine	60 -70 %
Alpha-1 globulines	1-3 %
Alpha-2 globulines	7-11 %
Beta-1 globulines	6-9 %
Beta-2 globulines	2-5 %
Gamma globulines	8-16 %

6-2 Immunoélectrophorèse.

Principe. Les immunoglobulines monoclonales, marqueurs des gammopathies, sont détectées lors de l'électrophorèse des protéines. Elles se présentent sous forme de bandes anormales situées essentiellement dans les zones bêta ou gamma globulines. L'immunofixation effectuée à l'aide d'antisérums monospécifiques permet l'identification des bandes monoclonales dépistées par électrophorèse. Elle se réalise en quatre étapes :

1. Séparation électrophorétique des protéines en gel d'agarose.
2. Fixation et immunoprécipitation des protéines séparées par électrophorèse : application du fixateur et des antisérums sur le gel, au niveau des pistes de migration. Le fixateur et les antisérums diffusent dans le gel. Le fixateur précipite toutes les protéines et les anticorps précipitent les antigènes correspondants.
3. Elimination des protéines non précipitées par pompage et lavage. Les protéines précipitées restent piégées dans le gel.

4. Coloration des et comparaison de la position des bandes immunoprécipitées avec celle des bandes observées après électrophorèse des protéines

NB : Pour identifier de façon précise la nature de la bande monoclonale, l'échantillon est testé sur six pistes. Après électrophorèse, une piste (ELP) sert de référence grâce à la précipitation de toutes les protéines présentes ; les cinq autres pistes permettent de caractériser la ou les bandes monoclonales à l'aide des anticorps spécifiques anti-chaînes lourde gamma (IgG), alpha (IgA), et mu (IgM) et anti-chaînes légères kappa et lamda (libres et liées).

Réactifs.

Gel d'agarose prêt à l'emploi ;

Tampon Tri-Barbital en solution concentrée ;

Colorant violet acide en solution concentrée ;

Décolorant en solution concentrée ;

Diluant prêt à l'emploi ;

Fixateur prêt à l'emploi ;

Immunoglobulines totales de mammifères anti-chaînes lourdes gamma ;

Immunoglobulines totales de mammifères anti-chaînes lourdes alpha ;

Immunoglobulines totales de mammifères anti-chaînes lourdes mu ;

Immunoglobulines totales de mammifères anti-chaînes légères kappa ;

Immunoglobulines totales de mammifères anti-chaînes légères lambda ;

Applicateurs 6 dents ;

Papiers-filtres fins ;

Peignes de papiers-filtres ;

Papiers-filtres épais ;

Eau physiologique (non fourni).

Nous avons utilisé le même matériel que pour l'électrophorèse des protéines.

Technique.

I. Dépôt et migration.

Présence d'une bande monoclonale

☞ Poser le porte applicateur HYDRAGEL K20 à plat sur la paillasse et relever le chariot du porte applicateur.

☞ Déposer 120 ul d'eau distillée sur le plateau du porte applicateur et sortir le gel de son emballage tout en éliminant rapidement l'excès de liquide en surface à l'aide d'un papier filtre fin.

- ☞ Placer le gel (face orientée vers le haut) sur le plateau du porte applicateur contre la barrette et baisser le chariot jusqu'en position intermédiaire.
- ☞ Poser un applicateur à plat sur la paillasse, numérotation (puits) vers le haut et introduire 10ul d'échantillon de sérum dilué dans chaque puits. Le chargement de l'applicateur ne doit pas excéder 2 minutes.

Les échantillons de sérum doivent être dilués selon le tableau suivant :

Piste	sérum	Diluant
Piste immunologique G	20 µL	100 µL
Profilélectrophorétique ELP et autres pistes	30 µL	60 µL

- ☞ Eliminer la protection des dents de l'applicateur et la placer en position 6 sur le porte applicateur. Après 1 minute d'application, relever l'applicateur puis le jeter.
- ☞ Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse, selon la polarité indiquée sur le gel. Le gel est plongé dans le tampon (face orientée vers le bas) sur une distance de 1cm de chaque côté.
- ☞ Brancher la cuve au générateur en utilisant le programme 3. Après migration, débrancher la cuve et sortir le gel.

II. Immunofixation.

- ☞ Placer de nouveau le gel sur le porte applicateur comme précédemment.
- ☞ Mettre en place le masque 1 IF de dépôt des réactifs sur le porte applicateur et déposer les réactifs en procédant comme suit :

Piste	Volume	Désignation	couleur
ELP	40µL	Solution de fixation	jaune
G	25µL	Antisérums anti -chaînes lourdes gamma	rose
A	25µL	Antisérums anti chaînes lourdes alpha	Bleu foncé
M	25µL	Antisérums anti chaînes lourdes mu	Jaune vert
K	25µL	Antisérums anti chaînes légères kappa	Vert clair
L	25µL	Antisérums anti chaînes légères lambda	Bleu clair

- ☞ Laisser incubé à température ambiante pendant 5 minutes.

- ☞ Eliminer les réactifs à l'aide d'un peigne de papier filtre introduit dans la fente pratiquée dans la partie inférieure des pistes d'incubation pendant 30 minutes sans pénétrer dans le gel.
- ☞ Retirer le masque et appliquer parfaitement un papier filtre épais sur toute la surface du gel et laisser absorber pendant 5 minutes.
- ☞ Retirer le papier filtre et laver le gel verticalement en eau physiologique pendant 5 minutes, piste ELP vers le bas.
- ☞ Poser le gel à plat sur la paillasse et appliquer un papier filtre épais sur toute la surface du gel. Mettre dans l'incubateur-sécheur jusqu'à séchage complet du papier filtre (7 minutes).
- ☞ Après séchage, immerger verticalement le gel sec en eau physiologique pendant 3 minutes.
- ☞ Le gel est en fin plongé pendant 4 minutes dans la solution de coloration et 3 minutes successivement dans trois bains de solution de décoloration.
- ☞ Sécher le gel sous air chaud à 80 °C.

III. Résultats et interprétations.

Absence de bande monoclonale

- ☞ Un sérum normal montre une zone colorée diffuse d'immunoglobulines polyclonales sur toutes les pistes.
- ☞ Une hypergammaglobulinémie est caractérisée par une zone diffuse très fortement colorée, avec absence de bande étroite.

Présence d'une bande monoclonale

- ☞ Une gammopathie (présence d'une immunoglobuline monoclonale) est caractérisée par une bande étroite détectée avec l'un des anti-chaînes lourdes (gamma, alpha ou mu) et avec des anti-chaînes légères (kappa ou lambda).
- ☞ L'absence de réaction avec l'une des anti-chaînes lourdes appliquée mais avec présence d'une chaîne légère peut signifier :
- ☞ la présence d'une chaîne légère libre qu'il conviendra de confirmer avec les anti-chaînes légères libres (kappa libre ou lambda libre),
- ☞ la présence d'une gammopathie à Ig D ou Ig E qu'il conviendra de confirmer avec les anti-chaînes lourdes delta ou epsilon.

6.3. Contrôle du taux Hb, Ht et du nombre de GR.

IL a été réalisé par nous même au centre nationale de transfusion sanguine grâce à l'utilisation de l'automate ABX. Nous avons eu souvent recours à la méthode manuelle en cas de panne de la machine ou de manque de réactifs.

6.3.1. L'hématocrite.

L'hématocrite représente le rapport entre le volume des hématies et le volume sanguin total.

Les résultats normaux de l'hématocrite sont :

Homme 45% (40-54%)

Femme 40% (35-47%)

Enfant 41% (36-44%)

Nouveau-né 55% (44-62%)

On ne peut parler de diminution de l'hématocrite que lorsque les chiffres sont inférieurs à 40% chez l'homme et 35% chez la femme.

6.3.2. Le dosage de l'hémoglobine.

L'hémoglobine est un pigment protéique constitué de l'hème et de la globine.

Les valeurs normales de l'hémoglobine sont :

Homme 12-16g/dl

Femme 13-18g/dl

Enfant 12-16g/dl

Nouveau - né 14-20g/dl

LE dosage de l'hémoglobine est un examen qui revêt d'une grande importance sur le plan du diagnostic hématologique.

En particulier c'est sur lui que repose le diagnostic d'une anémie. L'Hb participe aussi, en association avec le taux d'hématocrite, à la définition de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine.

L'hémoglobine assure deux fonctions essentielles : le transport de l'oxygène des poumons aux tissus et le transport du gaz carbonique (CO₂) des tissus vers les poumons.

6.3.3. L'automate d'hématologie A B X.

6.3.3.1. Description.

- **L'instrument** : L'ABX MICROS est disponible en quatre versions :

ABX MICROS OT ; OS, CT et CS.

ABX MICROS OT est un modèle tube ouvert où l'utilisateur doit retirer le bouchon de tube de prélèvement avant de présenter le tube sous l'aiguille pour l'aspiration de l'échantillon. La quantité de sang total aspirée est de 12µl. L'appareil d'hématologie ABX MICROS OT est un appareil entièrement automatique (contrôlé par un microprocesseur) qui permet l'analyse hématologique in vitro d'échantillon de sang total. La cadence d'analyse est de 42 échantillons par heure. Cette cadence inclut le temps d'aspiration de l'échantillon, l'analyse et le rendu des résultats sur l'afficheur et sur imprimante.

L'ABX MICROS OT peut être configuré en 5, 8, 16, 18 paramètres selon son réglage interne et l'utilisation de réactif approprié. Nous avons utilisé ABX MICROS OT configuré en 8 paramètres : globule rouge (Gr) ; globule blanc (Gb) ; hématocrite (Ht) ; hémoglobine (Hb) ; concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) ; volume globulaire moyen (VGM) ; teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) ; plaquettes.

L'ABX MICROS OT est un appareil de taille compacte et comporte 6 parties principales :

L'alimentation électrique ; la carte électronique avec son microprocesseur, la pneumatique de dilution ; un panneau de contrôle incluant un clavier matriciel et un afficheur LCD ; un comportement des réactifs et une imprimante pour l'impression des résultats.

- **Les réactifs** : Nous avons utilisé 3 types de réactifs :

ABX MINIDRIL : C'est une solution aqueuse limpide inodore jouant le rôle de diluant pour le comptage et la différenciation des cellules sanguines et la mesure de l'hématocrite sur les compteurs de cellules sanguines ABX.

Ce réactif est composé essentiellement de : chlorure de sodium (0,78%) ; chlorure de potassium (0,12%) ; azide de sodium (inférieure à 0,1%) permettant la conservation du réactif.

ABX MINICLEAN : C'est une solution enzymatique à action protéolytique pour le nettoyage des compteurs de cellules sanguines ABX.

Elle est composée par : un tampon organique (inférieur à 0,2%) ; un enzyme protéolytique(0,2%).

ABX MINILYSE : c'est une solution aqueuse, limpide qui permet de lyser les cellules sanguines et de déterminer la concentration en hémoglobine.

Elle contient du cyanure de potassium à une concentration de 0,06%, un sel d'ammonium quaternaire et un tampon phosphate salin contenant de l'azide de sodium à une concentration inférieure à 0,1%.

6.3.3.2. Mode opératoire.

Après avoir vérifier le branchement de la machine et de l'imprimante à la source d'énergie, on procède à la mise en marche de la machine en appuyant sur le bouton Marche/Arrêt situé à l'arrière droit du MICROS OT. Le voyant « Sel » de la machine s'allume et il apparaît sur l'écran « Attendez 3 minutes » (pour accélérer la procédure on peut appuyer sur la touche « ESC »).Après les trois minutes, l'opérateur appui sur la touche « Start up » qui permet le nettoyage de la machine en prenant le diluant.

La machine fait un comptage initial pour vérifier si le rinçage est bien effectué, dans le cas contraire elle reprend automatiquement un deuxième et éventuellement un troisième cycle de « Start up ». Ce rinçage automatique ne s'effectue pas quand la valeur des paramètres hématologiques du cycle à vide se situe en dessous des limites suivantes:

GB : $0,3 \cdot 10^3$; GR : $0,02 \cdot 10^6$; HB : 0.3g/l ; PLA : $8 \cdot 10^3$.

Chaque cycle « Start up » de la machine dure deux minutes. A la fin de ce cycle la machine affiche sur l'écran le « menu principal ».

On appui alors sur la touche « Enter » pour continuer. On introduit le numéro d'identification de l'échantillon, la machine bien rincée fait sortir l'aiguille de prélèvement.

Après avoir vérifié l'absence de coagulum dans le tube prélèvement, on remue trois à quatre fois le tube (sans entraîner une lyse des celles) et on introduit l'aiguille de prélèvement jusqu'au fond du tube suivit d'un appui sur la gâchette. Lorsque le voyant de cycle passe au vert, on retire le tube de sa position de prélèvement.

Le prélèvement s'effectue et l'aiguille reprend sa position initiale. Au bout de deux minutes le comptage est effectué et le résultat est affiché sur l'écran (mais le plus souvent la machine fait deux comptages successifs et affiche la moyenne.

On appuie sur la touche Marche/Arrêt de l'imprimante pour l'impression des résultats. S'il y'a d'autres analyses à faire on reprend la procédure d'identification et de départ. Après les analyses on appuie sur la touche stand by pour le dernier lavage. L'arrêt de la machine se fera en fin d'analyse par appui sur la touche Marche/Arrêt.

6.4. Recherche de plasmodium chez les donneurs.

Nous avons effectué pour chaque échantillon une goutte-épaisse plus frottis mince. Les plasmodiums sont recherchés sur le frottis après immersion à l'objectif 100 et sur la goutte-épaisse.

a. Matériels

- Microscope
- Lames, portoirs, compresses, bacs de coloration, alcool, huile à immersion,
- Micro Pipettes avec embouts correspondant ;
- Réactif de M .G .G.

b. confection et coloration du frottis mince.

Sur une lame dégraissée, déposer à une extrémité une goutte de sang ; placer en avant de cette goutte une deuxième lame ; laisser le sang s'étaler dans le dièdre formé par les deux lames ; faire glisser rapidement et régulièrement la lame(étaleuse) vers l'extrémité libre de la lame porte objet ; faire sécher rapidement par agitation.

Le réactif de MAY-GRUNWALD et GIEMSA permet de colorer les lames séchées.

Recouvrir la lame de M.G et laisser au contacte 3 minutes ; ajouter 1ml d'eau distillée ; laisser agir une minute ; rejeter le tout et colorer par la solution de GIEMSA préparée extemporainement ; laisser au contacte 15-20 minutes ; laver, sécher, et observer au microscope .

c. Confection et coloration de la goutte-épaisse.

Une goutte de sang est déposée sur une lame dégraissée, faire un étalement épais, au centre de la lame avec le coin d'une lame propre, jusqu'à épaissement uniforme. Laisser sécher à l'air par exemple sur un plan de travail ensoleillé, a condition de protéger l'étalement contre les mouches et la poussière .

Les goutte-épaisses sont colorées à l'aide de colorant de GIEMSA dilué.

Deshémoglobiner la goutte épaisse par de l'eau distillée, étaler sur la goutte épaisse de colorant de GIEMSA rapidement préparé (dilué) pendant 15-20 minutes, laver la goutte épaisse avec de l'eau distillée, laisser sécher à l'air libre en maintenant la lame verticale sur un portoir.

7. La saisie et l'analyse des résultats.

La saisie du texte a été réalisé sur Windows 98 dans les logiciels Word et Excel .L'analyse des résultats a été faite sur EPI info version 6.04 fr. La comparaison des moyennes a été faite par le test d'Anova. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

RESULTATS

TABLEAU I : Répartition des donneurs selon les classes d'âge

Classes d'âge	Fréquences	Pourcentages
18-25 ans	33	27,5%
26-35 ans	41	34,2%
36-54 ans	46	38,3%
Total	120	100%

La moyenne d'âge des donneurs est de 33 ans \pm 9. Il y'a 38,3% de personnes âgées de 36-54 ans, 34,2% de 26-35 ans et 27,5% de 18-25 ans.

TABLEAU II : Répartition des donneurs selon le sexe

Sexe	Fréquences	Pourcentages
Féminin	7	5,8%
Masculin	113	94,2%
Total	120	100%

Les donneurs de notre échantillon sont majoritairement de sexe masculin (94,2%) et seulement 5,8% de sexe féminin.

TABLEAU III : Répartition des donneurs selon le poids

Poids	Fréquence	Pourcentage
54-60 kg	15	12,5%
61-100kg	101	84,2%
>100 kg	4	3,3%
Total	120	100%

Le poids moyen de nos donneurs est de 75,9 \pm 13,4kg . Les poids maximum et minimum sont respectivement de 130 kg et de 55Kg. La majorité des donneurs (84,2%) ont un poids compris entre 60-100 kg.

TABLEAU IV : Répartition des donneurs selon leur groupe ABO

Groupe ABO	Fréquences	Pourcentages
Groupe A	22	18%
Groupe B	32	27%
Groupe AB	6	5%
Groupe O	60	50%
Total	120	100%

Le groupe O est majoritaire (50%) suivi des groupes B (27%) et A (18%). Seulement 5% des donneurs sont du groupe AB.

TABLEAU V : Répartition des donneurs selon le taux de protéines totales sanguines.

Taux de protéines totales en g/l	Fréquences	Pourcentages
<60	3	2,5%
60-80	70	58,3%
>80	47	39,2%
Total	120	100%

Le taux moyen de protéines totales sanguines chez les donneurs est de $83,6 \pm 18,8$ g/l.

Le taux le plus faible est de 55g/l et le taux le plus élevé de 150g/l. La plupart des donneurs (58,3%) ont un taux de protéines totales normal (60-80g/l). Cependant 39,2% ont un taux anormalement élevé (plus de 80g/l). Seulement 2,5% des donneurs ont un taux de protéines totales faibles (55-60g/l).

TABLEAU VI : Répartition des donneurs selon leur taux d'albumine sanguine.

Taux d'albumine en %	Fréquence	Pourcentage
<60	41	34,1%
60-70	74	61,7%
>70	5	4,2%
Total	120	100%

Le taux moyen d'albumine chez les donneurs est $60,9 \pm 6,3\%$ des protéines totales. Les taux le plus faible et le plus élevé sont respectivement de 13,1% et de 74,5% de protéines totales.

La majorité des donneurs (61,7%) ont un taux d'albumine sanguine normal compris entre 60-70% de protéines totales et seulement 4,2% ont plus de 70% de protéines totales. Un taux d'albumine faible <60% de protéines totales est observé chez 34,1% des donneurs.

TABLEAU VII : Taux de α 1-globulines chez les donneurs de sang

Taux de α 1-globulines en %	Fréquences	Pourcentages
1-3	108	90%
>3	12	10%
Total	120	100%

Le taux moyen de α 1-globulines chez les donneurs est de $2,8 \pm 2,2\%$ de protéines totales. Le taux le plus faible est de 1,3% de protéines totales et le taux le plus élevé est de 13,6% de protéines totales. La plupart de nos donneurs (90%) ont un taux de α 1-globulines normal compris entre 1-3% de protéines totales et seulement 10% ont plus de 3% de protéines totales.

TABLEAU VIII : Taux de α 2-globulines chez les donneurs de sang

Taux de α 2-globulines en %	Fréquences	Pourcentages
<7	13	10,8%
7-11	98	81,7%
>11	9	7,5%
Total	120	100%

Le taux moyen de α 2-globulines chez les donneurs est de $8,7 \pm 1,5$ de protéines totales

Le taux le plus faible est 5,8% de protéines totales et le taux le plus élevé est de 14,5% de protéines totales. La majorité de nos donneurs (81,7%) ont un taux de α 2-globulines normal compris entre 7-11% de protéines totales et seulement 7,5% ont plus de 11% de protéines totales. Un taux de α 2-globulines faible < 7% de protéines totales est observé chez 10,8% des donneurs.

TABLEAU IX : Taux de β -globulines chez les donneurs de sang

Taux de β -globulines en %	Fréquences	Pourcentages
<8	14	11,7%
8-14	100	83,3%
>14	6	5%
Total	120	100%

Le taux moyen de β -globulines chez les donneurs est de $10,4 \pm 2,9\%$ de protéines totales.

Le taux le plus faible est de 2,1% de protéines totales et le taux le plus élevé est de 21,3% de protéines totales. La majorité de nos donneurs (83,3%) ont un taux de β -globulines normal compris entre 8-14% de protéines totales et seulement 5% ont plus 14% de protéines totales. Un taux de β globulines faibles <8% de protéines totales est observé chez 11,7% de donneurs.

TABLEAU X : Taux de γ -globulines chez les donneurs de sang

Taux de γ -globuline en %	Fréquences	Pourcentages
<8	5	4,1%
8-16	50	41,7%
>16	65	54,2%
Total	120	100%

Le taux moyen de γ -globulines chez les donneurs est $16,8 \pm 5,1\%$ de protéines totales. Le taux le plus faible est de 4,5% de protéines totales et le taux le plus élevé est de 49,4% de protéines totales. La majorité de nos donneurs (54,2%) ont un taux de γ -globuline élevé (>16% de protéines totales). Cependant 41,7% de nos donneurs ont un taux normal compris entre 8-16% de protéines totales et seulement 4,1% des donneurs ont un taux de γ -globulines faible <8% de protéines totales.

TABLEAU XI : Taux de protéines totales sanguines par tranches d'âges des donneurs de sang

Taux de protéines sanguines totales	Ages			
	18-25ans	26-35ans	36-54ans	Total
<60	1	0	2	3
60-80	15	25	30	70
>80	17	16	14	47
Total	33	41	46	120

Les taux moyens de protéines totales par tranches d'âge sont : $85,5 \pm 19,4\text{g/l}$ pour la tranche d'âge 18 à 25 ans, $86,2 \pm 22,6\text{g/l}$ pour la tranche d'âge 26-35 ans et $79,8 \pm 13,9\text{g/l}$ pour la tranche d'âge 36-54 ans. La différence entre ces moyennes est statistiquement non significative ($p=0,23$). 65 % des donneurs âgés de 36-54 ans ont un taux de protéines totales compris entre 60 à 80g/l contre 61% des donneurs âgés de 26-35 ans et 45% des donneurs âgés de 18 à 25 ans.

TABLEAU XII : Taux de protéines totales sanguines selon le sexe des donneurs de sang

Sexe	Taux de protéines totales			
	<60	60-80	>80	Total
Féminin	0	6	1	7
Masculin	3	64	46	113
Total	3	70	47	120

Le taux moyen de protéines totales chez le sexe féminin est de $75,8 \pm 8,1\text{g/l}$ contre $84,1 \pm 19,2\text{g/l}$ chez le sexe masculin. La différence entre ces moyennes n'est pas statistiquement significative ($p = 0,15$). 85% des donneurs de sexe féminin ont un taux de protéines totales compris entre 60 à 80g/l contre 56,6% des donneurs de sexe masculin.

TABLEAU XIII : Taux de protéines totales sanguines selon les classes de poids chez les donneurs de sang.

Classes de poids	Taux de protéines totales en g/l			
	<60	60-80	>80	Total
54-60kg	1	6	8	15
60-100kg	2	62	37	101
>100kg	0	2	2	4
Total	3	70	47	120

Les taux moyens de protéines totales selon les classes de poids sont de $84,4 \pm 19,6$ g/l pour la classe de poids 54-60kg ; $83,2 \pm 18,7$ g/l pour la classe de poids 60-100kg et $89,2 \pm 23,5$ g/l pour la classe de poids >100kg. La différence entre ces moyennes est statistiquement non significative ($p=0,81$). 61% des donneurs pesant 60 à 100kg ont un taux de protéines totales compris entre 60 à 80g/l contre 50% des donneurs pesant plus de 100kg et 40% des donneurs pesant 54 à 60kg.

TABLEAU XIV : Variation du protidogramme selon les saisons chez les donneurs de sang

Saisons	P.T g/l	A %	G %	α 1-G %	α 2-G %	β -G %	γ -G %	A/G
Saisons sèche (N=60)	89,750	60,843	39,243	3,258	8,857	10,425	16,620	1,6
Saison pluvieuse (N=60)	77,443	61,127	38,810	2,532	8,730	10,573	17,033	1,5

N= nombre de donneurs examinés.

Le taux moyen de protéines totales chez les donneurs pendant la saison sèche est de $89,7 \pm 21,2$ g/l contre $77,4 \pm 13,7$ g/l pendant la saison pluvieuse. La différence entre ces moyennes est statistiquement significative ($p < 0,01$). Le taux moyen d'albumine chez les donneurs pendant la saison sèche est de $60,8 \pm 8,3$ % de protéines totales contre $61,1 \pm 3,2$ % de protéines totales pendant la saison pluvieuse. La différence entre ces moyennes n'est pas significative ($p = 0,8$). Le taux moyen de globulines totales (G) chez les donneurs pendant la saison sèche est de $39,2 \pm 8,4$ % de protéines totales contre $38,8 \pm 3,2$ % de protéines totales pendant la saison pluvieuse. La différence entre ces moyens est statistiquement non significative ($p = 0,7$).

TABLEAU XV : Variation du nombre des globules rouges (GR), des taux d'hémoglobine (Hb) et d'hématocrite (Hte) suivant les saisons chez les donneurs de sang.

Saisons	GR ($10^6/\text{mm}^3$)	Hb (g/dl)	Ht (%)
Saison sèche (N= 60)	4,58	13,60	39,65
Saison Pluvieuse (N=60)	4,45	13,09	39,28

N : Nombre de donneurs examinés

Le taux moyen de GR chez les donneurs pendant la saison sèche est de $4,5 \pm 0,7$ $10^6/\text{mm}^3$ contre $4,4 \pm 0,7$ $10^6/\text{mm}^3$ pendant la saison pluvieuse. La différence entre ces moyennes est statistiquement non significative ($p = 0,2$). Le taux moyen d'Hb chez les donneurs pendant la saison sèche est de $13,6 \pm 16,3$ g/dl contre $13,1 \pm 1,4$ g/dl pendant la saison pluvieuse. La différence entre ces moyens est statistiquement non significative ($p = 0,3$). Le taux moyen d'Hte chez les donneurs pendant la saison sèche est de $39,6 \pm 5,6$ % contre $39,2 \pm 4,2$ % pendant la saison pluvieuse. La différence entre ces moyens est statistiquement non significative ($p = 0,6$).

TABLEAU XVI : Prévalence de l'infection palustre chez les donneurs de sang selon les saisons

Saisons	Gouttes épaisses		
	positives	négatives	Total
Saison sèche	15 (25%)	45	60
Saison Pluvieuse	33 (55%)	27	60

Les prévalences de l'infection palustre en saison sèche et en saison pluvieuse sont respectivement de 25% et 55% chez les donneurs de sang examinés.

COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

Le but de cette étude était d'examiner le protidogramme et ses variations saisonnières chez les donneurs de sang à Bamako. Pour cela elle a été conduite au CNTS et a porté sur 120 donneurs volontaires réguliers de sang à partir du 3^{em} don.

I. Au plan méthodologique

Ce nombre relativement réduit de notre échantillon de donneurs s'explique par le coût élevé des réactifs utilisés. En plus du protidogramme, nous avons déterminé trois paramètres de l'hémogramme et la prévalence de l'infection palustre chez les donneurs examinés en saison sèche et pluvieuse. La technique d'immunoélectrophorèse a été aussi mise au point.

Aucune difficulté de participation à l'étude n'a été rencontrée car tous les donneurs de l'échantillon ont spontanément donné leur consentement éclairé.

II. Caractéristiques socio-démographiques des donneurs de sang à Bamako

II.1. Répartition des donneurs selon l'âge :

Nos donneurs appartiennent pour la plupart à la tranche d'âge 18-54 ans. C'est la population régulière de donneurs de sang du CNTS. En effet les tranches d'âges non représentées dans notre échantillon notamment les 0-17 ans et les plus de 60 ans sont ceux exclus du don de sang.

II.2. Répartition des donneurs selon le sexe :

Les donneurs de notre échantillon sont majoritairement de sexe masculin (94,2 %) et seulement 5,8 % de sexe féminin. Ceci s'explique par les multiples Contre-indications du don de sang chez les femmes (menstruation, grossesse, allaitement), à tout ceci il faut ajouter que les hommes donnent plus souvent leur sang que les femmes.

En effet Sarro [25] en 2002, Yerbanga [32] en 1997 et Kiemtore [16] en 1998 ont eu respectivement un sexe ratio de 4, 5, et 8 en faveur des hommes chez les donneurs de sang du CNTS.

III. Répartition des donneurs selon le poids :

La majorité des donneurs (84,2 %) ont un poids compris entre 60-100 Kg avec un poids moyen de 75 Kg. Lors de son étude sur 109 donneurs de sang Sarro [25] a eu un poids moyen de 72 Kg. Il est à noter que le poids minimum de 55 kg est obligatoire pour le don de sang.

IV. Répartition des donneurs selon le groupe sanguin :

Les donneurs sont majoritairement du groupe sanguin O (50 %). Seulement 5 % des donneurs sont du groupe AB. Ceci est conforme à la répartition observée dans toutes les études effectuées au Mali.

V. Etude du protidogramme chez les donneurs de sang

V.1. Taux de protéines totales sanguines chez les donneurs de sang :

La plupart des donneurs (58,3 %) ont un taux de protéines totales normal compris entre 60-80 g/l avec un taux moyen de 83 g/l et seulement 2,5 % ont un taux faible. Cependant 39,2 % de nos donneurs ont un taux élevé (>80g/l) et cela pourrait s'expliquer par l'élévation du taux d'albumine dont on sait que le pouvoir de retenir l'eau est grand sans oublier aussi une élévation des γ -globulines.

Busson, Trapet et Lecoq [5], précisent que les principales modifications portent sur les fractions extrêmes du spectre électrophorétique : l'albumine et les γ -globulines.

Van Den Berghe et Van Der Borgh [30] estiment que le taux de protéines totales est normal dans 95 % des cas. Par contre Charmot et all [6,7] trouvent une hyperprotéïnémie franche.

V.2. Taux d'albumine sanguine chez les donneurs de sang :

La majorité des donneurs (61,7 %) ont un taux d'albumine sanguine normal compris entre 60-70 % de protéines totales avec un taux moyen de 60 % de protéines totales et seulement 4,2 % ont un taux élevé. Ceci prouve que les produits sanguins fournis par le CNTS sont riches en albumine. Cependant 34,1 % des donneurs ont un taux d'albumine faible. IL semble que le facteur nutritionnel soit la cause de ce taux. Etienne [9] trouve un taux d'albumine diminué par rapport à une augmentation du taux des γ -globulines.

Itoua [13], Sombo [27] ont constaté cette hypoalbuminémie.

V.3.Taux de α 1 globuline chez les donneurs de sang :

La plupart de nos donneurs (90 %) ont un taux de α 1 globuline normal compris entre 1-3 % de protéines totales avec taux moyen 2,8% de protéines totales et seulement 10 % ont un taux élevé. La valeur la plus faible (1,3 % de protéines totales) est aussi normale. Ceci prouve que la plupart de nos donneurs ne présentent pas de pathologies liées à des variations de ces protéines et que les poches fournies sont sans danger.

V.4. Taux de α_2 globulines chez les donneurs de sang :

La plupart de nos donneurs (81,7 %) ont un taux de α_2 globulines normal compris entre 7-11 % de protéines totales avec un taux moyen de 8,7 % de protéines totales. Cependant un taux faible et un taux élevé sont observés respectivement chez 10,8 % et 7,5 % des donneurs.

V.5. Taux de β globuline chez les donneurs de sang :

La majorité de nos donneurs (83,3 %) ont un taux de β -globulines normal compris entre 8-14 % de protéines totales avec un taux moyen de $10,4 \pm 2,9$ % de protéines totales. Cependant un taux faible et un taux élevé sont observés respectivement chez 11,7 % et 5 % des donneurs.

Nos résultats concernant les α_1 , α_2 et β globulines sont comparables à ceux obtenus par Etienne [9] et Blatt [3].

V.6. Taux de γ - globulines chez les donneurs de sang :

Un taux normal de γ -globulines est observé chez 41,7 % de donneurs avec un taux moyen de $16,8 \pm 5,1$ % de protéines totales et seulement 4,1 % de donneurs ont un taux faible. Cependant la majorité de nos donneurs (54,2 %) ont un taux de γ -globulines élevé. De nombreux auteurs ont signalé une hypergammaglobulinémie chez les sujets de race noir vivant en milieu tropical. Ces concentrations d'immunoglobulines chez ces sujets prouvent que leur système immunitaire est fréquemment stimulé ce qui constitue une réponse physiologique (synthèse d'anticorps) à l'environnement face aux agressions par les agents parasitaires, bactériens et viraux de toutes sortes.

Charmot et all [6,7] pensent que les variations observées dans la formule protéique sont dues principalement à l'hypergammaglobulinémie.

V.7. Taux de protéines totales par tranche d'âge chez les donneurs de sang :

La plupart (65 %) des donneurs âgés de 36-54 ans ont un taux de protéines totales normal. On n'observe pas de différence entre les taux moyens de protéines totales au niveau des classes d'âge. La majorité de nos donneurs nous fournissent du sang suffisamment riche en protéines.

V.8. Taux de protéines totales selon le sexe des donneurs de sang :

Il n'y a pas de différence de taux moyens de protéines totales selon le sexe.

V.9. Taux de protéines totales sanguines selon les classes de poids chez les donneurs :

La majorité des donneurs pesant 60 à 100 Kg ont un taux de protéines totales normal. La différence entre les taux moyens de protéines totales au niveau des classes de poids n'est pas significative. Ce qui indique que le poids n'a pas d'influence sur les protéines du sang.

VI. Variation du protidogramme selon les saisons chez les donneurs :

Les taux moyens de protéines totales sont différents suivant les saisons ($p < 0,01$). Cependant lorsqu'une analyse plus détaillée est effectuée en comparant les taux moyens des différentes fractions électrophorétiques, il n'y a pas de différence significative entre les saisons et ce malgré une plus grande prévalence de l'infection palustre pendant la saison pluvieuse.

VII. Variation du nombre de GR, du taux d'Hb et d'Ht suivant les saisons chez les donneurs de sang :

La différence observée entre les taux moyens de ces paramètres est non significative. Cela indique que malgré la prévalence de l'infection palustre en saison pluvieuse ces paramètres ne sont pas affectés chez nos donneurs de sang.

VII. Prévalence de l'infection palustre chez les donneurs de sang examinés :

Les prévalences de l'infection palustre en saison sèche et en saison pluvieuse sont respectivement de 25 % et 55 % chez les donneurs de sang examinés.

Touré, Sangaré, Doumbo [29], ont trouvé une prévalence de 7,2% en zone sahélienne et 83,5% en zone soudanienne. Selon eux, cette prévalence dépend de la pluviométrie.

CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

I. Conclusion :

Les résultats obtenus au cours de notre étude montrent que les produits sanguins du CNTS présentent les caractéristiques de qualité recherchées. Cette étude nous a en même temps permis de mettre au point la technique d'immunoélectrophorèse pour la première fois au CNTS. Nous avons tiré les conclusions suivantes :

La majeure partie de nos donneurs ont un protidogramme normal.

- ☞ 58,3 % des donneurs ont un taux de protéines totales normal avec une moyenne générale de 83 g/l.
- ☞ 61,7 % de donneurs ont un taux d'albumine normal avec une moyenne générale de 60 % de protéines totales.
- ☞ 90 % des donneurs ont un taux d'alpha 1 globulines normal avec une moyenne générale de 2,8 % de protéines totales.
- ☞ 81,7 % des donneurs ont un taux d'alpha 2 globulines normal avec une moyenne générale de 8,7 % de protéines totales.
- ☞ 83,3 % des donneurs ont un taux de bêta globulines normal avec une moyenne générale de 10,4 % de protéines totales.
- ☞ 54,2% des donneurs ont un taux de gammaglobulines élevé avec une moyenne générale de 16,8 % de protéines totales.
- ☞ La variation du protidogramme chez les donneurs n'a pas une saisonnalité comparable à celle de la transmission du paludisme .

Le paludisme ne devrait pas être incriminé chez nos donneurs de sang comme une cause de variabilité du protidogramme .

- ☞ Le taux d'hémoglobine aussi ne démontre pas de variation saisonnière chez nos donneurs. Ceci nous réconforte dans notre argument ci dessus concernant la cause de variabilité du protidogramme

II. Recommandations :

A partir de ces conclusions nous avons formulé les recommandations suivantes :

Au CNTS

- ☞ Effectuer le protidogramme au moins une fois chez le donneur de sang régulier .
- ☞ Au personnel du CNTS une bonne utilisation de la technique mise au point.

A l'autorité de tutelle

- ☞ Doter le CNTS de moyens matériels et financiers lui permettant d'effectuer un bilan de santé associant le protidogramme chez tous les donneurs volontaires réguliers de sang.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1- Abdou Sougou.

Les immunoglobulines, structure ; métabolisme et pathologie. Thèse pharm., Dakar, 1981, n°106.

2- Baltt J. F.

Immunologie. 2è ed. Flammarion Medecine-science. 1971.

3- Blatt Michel Gabriel.

Etude de l'évolution de la protidémie totale et de ses constituants électrophoretiques en milieu rural sénégalais chez les enfants d'âge préscolaire. Thèse Méd. Dakar, 1967.

4- Boiron H.

Etude de la protidémie de l'africain résidant à Dakar. Variations observées dans les suites de couches. Bull. Soc. Méd. Afrique noire langue française. , 1961.

5- Busson F., Trapet P. et Lecoq F.

Exploration des protéines sériques. Application aux sérums d'africains de Dakar. Med. Trop., 1953,13, (6), 977-1001. Bull. Med. A. O. F., 1954, 11,(1), 11-39.

6- Charmot G., Busson F., Masseyeff R. et Guidiceli P.

Application de l'électrophorèse sur papier à l'étude de la protidémie chez l'adulte Africain. Comparaison avec l'Européen. Bull. Méd. A.O.F., 1953, 10, 153-163.

7- Charmot G., Linhard J., Guidiceli P. et Trapet P.

Intérêts cliniques des perturbations de l'équilibre protidique en pathologie tropicale. Considération sur la « dysprotéïnémie Africaine ». Méd. Trop., 1953, 13, (6), 961-976.

8- David F., Brown M. B.

Observation on some serum components in mothers and in their newborn enfants. Am. J. obst. Gym ; 1959, (3), 556.

9- Etienne Nicola Joseph.

Recherche effectuée à Dakar sur la protéïnémie et ses variations. Thèse Med. Dakar 1962.

10- Gajdos A.

Biochimie des immunoglobulines, médecine et biochimie, 2è série, Masson éd. Paris,1971.

11- Girad M. Dechosal J. et Rousselet F.

Pratique d'électrophorèse sur papier en biologie clinique. Doin et Cie éd, N°286.

12- Goudemaud et Delmas-Marsalety.

Elements d'immuno-hématologie. Ed. Flammarion, 1970.

13- Itoua-Ngaporo A.

Les protéines sériques chez les Brazzavillois à partir d'une étude faite chez les sujets donneurs de sang. Méd. Afrique Noir, 1978.

14- Jean Jacques Vieillard.

Electrophorèse des protéines du liquide cephalo rachidien chez l'africain de l'ouest. Thèse Méd, Dakar, 1972.

15- Kamoun P.

sémiologie biochimie, Amical Faculté de médecine. Necker Enfants Malades, PCEM2, 1985-86.

16- Kientore Patrick M. N. G.

Les anticorps antitoxoplasmiques chez les donneurs de sang et les malades atteints du SIDA à Bamako .Thèse Pharm. Bko., 1998.

17- Malinga Mpaka Paul.

Evaluation des immunoglobulines au cours du Kwashork, thèse Med, Dakar 1969, 3.

18- Pierre Louisot.

Biochimie structurale, protéines tomev, 3è Ed revue, corrigée et augmentée.

19- Pierre Louisot.

Biochimie générale, métabolique, structurale, sémiologique, Paris SIMEP, 1983, N°7368.

20- Polonoski M.

Biochimie médicale, 8è ed, fascicule III, P95.

21- Polnoski M.

Biochimie médicale, 1977, fascicule IV, ed. Masson.

22- Porter R. R.

The structure of immunoglobulins, Essays in Biochemistry, 1967, P1-24.

23- Preud'Homme J. C.

Les syndromes immunoprolifératifs dans « Immunologie » de J. F. Bach, Ed. Flammarion Médecine science.

24- Revillard.

Immunologie, avec la collaboration de l'association des enseignements d'immunologie des universités de langue française (ASSIM) 3è ed.

25- Sarro Y.S.

Le bilan de l'hémostase chez les donneurs de sang à Bamako. Thèse Pharm, Bko.,2002.

26- Schapira G.

Elements de biochimie clinique et physiologique, Paris, Flammarion,
Med science 1981, N°2852.

27- Sombo-Mambo F., Seka-Seka J., Cabannes R.

Etude des protéines totales et du protidogramme dans deux populations de Côte d'ivoire.
Publ. Méd. Afrique 1988.

28- Tissani R. J.

Microélectrophorèse sur papier du sérum de l'adulte (protéines, glyco et lipoprotéines) étude
statistique. Thèse Médecine Lyon, 1955.

29- Touré Y, Sangaré O, Doumbo O.

Le paludisme dans le sahel: l'exemple du Mali.

Maladie tropicale transmissible. Ed. AU ELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris 1989.

PP 11-32

30- Van Den Berghe (L.) et Van Der Borght H.

Recherche sur le taux de protéines du sang et du plasma chez les indigènes du Kwanga(Congo
Belge).Conf. interafricaine sur l'alimentation et la nutrition, Dschang, Cameroun, 3-9 octobre
1949, 248-249.

31- Wurman F. et Wunderly.

Les protéines du sang humain « collection de l'institut pasteur »,

Flammarion ed., Paris, 1961.

32- Yerbanga. F.X.

Antigénémie HBs et paramètres hématologiques chez les donneurs de sang à Bamako. Thèse
Pharm, Bko, 1997.

ANNEXES

Résultat de l'immunoélectrophorèse chez un donneur au C.N.T.S.

Nom du donneur : A. S.

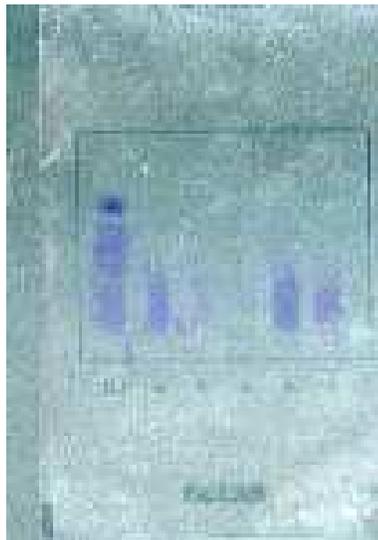
Age : 22 ans

I. Electrophorèse des protéines sériques :

Protéines totales	69 g/l
Albumine	54,3 %
Alpha 1	2,4 %
Alpha 2	11,3 %
Bêta	12.1 %
Gamma	19,9 %

Conclusion : Taux élevé de gammaglobulines (> 16% de protéines totales).

I. Immunofixation :



Conclusion : Hypergammaglobulinémie polyclonale, présence de zone diffuse très fortement colorée sur toutes les pistes (ELP, G,A, M, K, L).

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom: IBRAHIM

Prénom: Moussa

Titre: Le protidogramme chez les donneurs de sang à Bamako

Année : 2003

Pays d'origine: MALI

Ville de soutenance : Bamako

Lieu de dépôt: Bibliothèque de la faculté de Médecine de Pharmacie et d'odontostomatologie

Secteur: Transfusion sanguine

RESUME:

Le protidogramme est une technique d'analyse souvent employé lors des analyses biologiques. Il permet la séparation des différentes protéines contenues dans le sérum en cinq fractions : Albumine, Les globulines alpha 1 alpha2, bêta et les gamma globulines.

Cette étude nous a permis d'examiner le profil électrophorétique des donneurs volontaires réguliers au CNTS de Bamako, centre de référence pour la transfusion sanguine.

C'est une étude prospective entreprise de janvier 2002 en octobre 2002 chez 120 donneurs réguliers de sang.

Elle nous a permis de déterminer les taux moyens des différentes fractions protéiques:

58,3% des donneurs ont un taux de protéines totales normales avec un taux moyen de 83g /l

61,7% des donneurs ont un taux d'albumine normal avec un taux moyen de 60% de 90% des donneurs ont un taux d'alpha 1 globulines normal avec un taux moyen de 2,8% de protéines totales

90% des donneurs ont un taux d'alpha 1 globulines normal avec un taux moyen de 2,8% de protéines totales

81,7% des donneurs ont un taux d'alpha 2 globulines normal avec un taux moyen de 8,7% de protéines totales

83,3% des donneurs ont un taux de bêta globulines normal avec un taux moyen de 10,4% de protéines totales

41,7% des donneurs ont un taux de gammaglobulines normal avec un taux moyen de 16,8% de protéines totales

MOT CLE : Protidogramme

FICHE D'ENQUETE

I. Identification

Nom:.....
 Prénom:..... Age: Sexe:
 Groupe Sanguin:.....
 Profession:.....
 Ethnie:.....
 Adresse:..... Nombre de
 don:.....
 Période d'enquête:.....

II. Examens biologiques effectués au laboratoire:

Dosage des protides totaux:.....g/litre
 Electrophorèse des protéines sériques:

Fractions	%	Normes %
Albumine		60-70
Alpha 1 globuline		1-3
Alpha 2 globulines		7-11
Bêta 1 Globulines		6-9
Bêta 2 Globulines		2-5
Gamma globulines		8-16

Globules rouges/mm³ :.....
 Hématocrite en %:
 Hemoglobine en g/dl:.....

Goutte épaisse plus frottis : Positif Négatif

Bamako le:.....2002