

Comparaison de deux procédures d'élimination du fibrinogène interférant sur l'électrophorèse des protéines sériques

N. BEN REJEB,
L. BOUASSIDA,
H. FALFOUL,
M. A. NEGRA,
A. OMEZZINE,
N. NABLI,
A. BOUSSETTA,
A. BOUSLAMA

Résumé : l'électrophorèse semi automatisée des protéines sur gel d'agarose est hautement résolutive, mais sensible à de nombreux interférents dont le fibrinogène qui donne une bande mince sur le profil électrophorétique des protéines faisant penser à un pic monoclonal et sollicitant des tests d'exploration inutiles. Le but de notre travail est de comparer deux procédures d'élimination du fibrinogène : à l'éthanol et à la thrombine. Notre étude a été réalisée à partir de 33 patients chez qui deux types de prélèvements sanguins ont été recueillis : sur tube sans anticoagulant et sur citrate tri-sodique. Le fibrinogène a été apporté dans l'échantillon par mélange volume à volume du sérum et du plasma correspondant (S+P). Les électrophorèses de protéines sur sérum (profil de référence), sérum traité à l'éthanol, sérum traité à la thrombine, mélange (S+P), mélange (S+P) traité à l'éthanol et mélange (S+P) traité à la thrombine ont été réalisés sur l'appareil HYDRASYS (Sebia) et les protides totaux dosés par la méthode au biuret sur l'automate CX9 (Beckman COULTER). Le pic de fibrinogène migre entre les fractions bêta et gamma globulines. Le traitement à l'éthanol diminue l'ampleur du pic de fibrinogène sans le faire disparaître tout le temps et altère la répartition des fractions électrophorétiques.

Le traitement à la thrombine fait disparaître complètement le pic de fibrinogène sans altérer les autres fractions.

Mots clé : électrophorèse des protéines sériques, fibrinogène, éthanol, thrombine.

Comparison of two procedures for removing fibrinogen that interferes on serum protein electrophoresis

Abstract : Protein electrophoresis in agarose gel is a semiautomated method with enhanced resolution but which was subject to many interferences such as fibrinogen which appears at the beta/gamma junction similar to a monoclonal immunoglobulin band in monoclonal gammopathy. Our study is to compare between two procedures for removing fibrinogen with absolute ethanol and with thrombin from serum.

Our study included 33 patients. Two samples have been collected from every patient : the first one on tube without anticoagulant and the second one with trisodium citrate anticoagulant. Samples were supplied on fibrinogen by mixing serum with correspondent plasma (S + P). Protein electrophoresis were performed on HYDRASYS (Sebia) with : sera (reference pattern), sera treated with absolute ethanol, sera treated with thrombin, mixed (S + P),

Laboratoire de Biochimie
Clinique, CHU Sahloul de
Sousse, Tunisie.

mixed (S + P) treated with absolute ethanol and mixed (S + P) treated with thrombin. Total protein concentrations were determined by biuret method on the CX9 (Beckman COULTER) analyser.

Ethanol treatment decreased the fibrinogen band without removing it completely and modify electrophoretic fractions repartition.

thrombin treatment of serum was effective to remove completely fibrinogen band from electrophoretic pattern without modifying fractions repartition.

Key words : serum protein electrophoresis, fibrinogen, ethanol, thrombin

Introduction

L'électrophorèse des protéines sériques (EPP), semi-automatisée sur gel d'agarose, est hautement résolutive et permet le dépistage de différentes sortes de dysprotéïnémies. Cependant cette technique est sensible à plusieurs interférences au niveau de la phase pré-analytique telles que l'hémolyse, la lactescence et la présence de fibrinogène. Sur le profil électrophorétique, où l'on distingue classiquement cinq fractions : albumine, alpha1, alpha2, bêta et gamma globulines ; l'hémoglobine libre migre dans la zone des bêta, celle liée à l'haptoglobine migre dans la zone des alpha2, les lipides migrent dans la zone des alpha2 et le fibrinogène (Fg) migre entre les zones des bêta et gamma globulines (1). Un moyen d'éviter l'interférence du fibrinogène, est de travailler sur du sérum et non sur du plasma. Cependant, dans le cas d'une coagulation incomplète : (sujets ayant un problème de coagulation, traitement par des anticoagulants, mauvaise activation de la coagulation par certains matériaux qui composent les tubes de prélèvement...), une fraction de fibrinogène persiste toujours après décantation. Les traces de fibrinogène donnent un pic d'allure monoclonale migrant entre les deux zones des bêta et gammaglobulines pouvant mener à des erreurs d'interprétation et solliciter des tests d'exploration complémentaires inutiles et coûteuses (2,3). C'est pourquoi, plusieurs procédures d'élimination des traces de fibrinogène ont été décrites pendant leurs efficacités reste discutable (2,3,4). C'est dans ce but que nous nous proposons par cette étude de comparer l'efficacité de deux procédures d'élimination du fibrinogène : par traitements à l'éthanol et à la thrombine.

Matériels et Méthodes

Echantillons

Parmi les échantillons acheminés à notre laboratoire de biochimie clinique en vue d'analyses de routine, nous avons sélectionné ceux de 33 patients ayant chacun deux échantillons : l'un recueilli sur tube sans anticoagulant et l'autre sur citrate de sodium. Tous les échantillons étaient non hémolysés et appartenaient à des patients ayant des temps de céphaline activée normaux, ainsi on a exclu de notre étude les sujets traités par l'héparine qui interfère avec la thrombine.

Après centrifugation, nous avons récupéré les sérums (S) et les plasmas citratés (P) qui nous ont servi à l'étude des effets des deux procédures d'élimination du fibrinogène : précipitation à l'éthanol et coagulation à la thrombine. Le fibrinogène a été artificiellement apporté par le mélange volume à volume du sérum et du plasma (S+P) correspondant au même patient.

Trois des échantillons de sérums ne présentaient pas suffisamment de volume pour qu'ils soient traités par l'éthanol ou encore par la thrombine, c'est pourquoi nous les avons exclu de l'étude de comparaison des profils protéiques des sérums purs avec ceux traités à la thrombine et à l'éthanol.

Méthodes

Electrophorèse des protéines sur gel d'agarose : les EPP ont été réalisées avec le Kit HYDRAGEL 30 PROTEIN(E) (Réf : 4140, N° de lot : 038/01) sur l'analyseur HYDRASYS (Sebia, France). L'intégration a été effectuée

avec le scanner EPSON Expression 1680 Pro avec le logiciel Phoresis (Sebia, France). Les protéines totales ont été dosées par la méthode de biuret sur l'auto-analyseur CX9 (Synchron Clinical System CX9 PRO, BECKMAN COULTER Fullerton, USA).

Procédure d'élimination du fibrinogène par l'éthanol (3) :

Pour chaque patient, le sérum (S) et le plasma correspondant (P) ont été mélangés à volumes égaux. A 0,9 ml du mélange (S+P), nous avons ajouté 0,1 ml d'éthanol absolu (MERCK, à 99,9%). Nous avons de la même façon, traité les sérums purs correspondants. Après homogénéisation, nous avons laissé incuber une nuit à +4°C. Après centrifugation à + 4° C à 1100 g pendant 5 min, nous avons récupéré les surnageants ainsi prêts pour l'EPP.

Procédure d'élimination du fibrinogène par la thrombine (2) :

Pour chaque patient, le sérum (S) et le plasma correspondant (P) ont été mélangés à volumes égaux. Nous avons ajouté à 150 µl du mélange (S+P), 30 µl d'une solution de thrombine à 0,33U/µl (réactif N°1 du kit fibrinogène (FIBRINOGENE, Réf : 331, N° de lot : S88, Biomaghreb, Tunisie) puis incubé pendant 30 min à 37°C. Nous avons de la même façon traité les sérums purs correspondants.

Pour chaque patient, nous avons réalisé six EPP [sérum, sérum traité à l'éthanol, sérum traité à la thrombine, mélange (S+P), (S+P) traité à l'éthanol, (S+P) traité à la thrombine], excepté pour trois d'entre eux pour qui les EPP à partir des sérums traités à l'éthanol et de ceux traités à la thrombine n'ont pas été réalisées à cause des volumes sériques insuffisants.

Analyse statistique :

L'analyse statistique a été réalisée sur le logiciel Excel. La comparaison des moyennes a été effectuée par le test de Student et le seuil de significativité a été fixé à 0,05.

Résultats

Comparaison des profils protéiques en présence et en absence du fibrinogène

Le fibrinogène a été apporté aux échantillons par mélange volume à volume des sérums et de leurs plasmas correspondants.

Le pic de fibrinogène migre entre les fractions bêta et gamma globulines (figure 1) et augmente significativement la fraction des bêta globulines (16,51 vs 13,01% ; $P < 0,0001$). Aussi, nous avons noté une diminution significative dans la fraction des gamma globulines (tableau I).

Effets de l'éthanol et de la thrombine sur la distribution des fractions protéiques

Nous avons constaté que par rapport aux profils protéiques des sérums purs, non traités, ceux des sérums traités à l'éthanol présentent des fractions alpha2 augmentées (15,15 vs 13,26% ; $P = 0,002$) et bêta diminuées (10,58 vs 13,24% ; $P < 0,0001$).

Aucune différence significative n'a été constatée pour les fractions protéiques entre les sérums non traités et ceux traités à la thrombine (tableau II).

Effets des traitements à l'éthanol et à la thrombine sur l'élimination du pic de fibrinogène

Les traitements des mélanges (S+P) à l'éthanol et à la thrombine diminuent significativement la fraction des

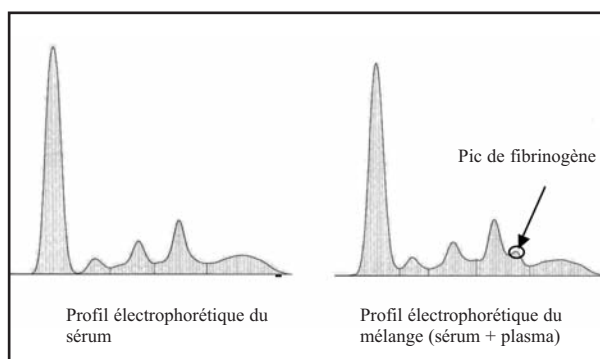


Figure 1 : Exemples de profils électrophorétiques du sérum et du mélange (sérum + plasma)

Tableau I : Comparaison des profils protéiques des sérums purs et des sérums supplémentés en fibrinogène (mélanges S+P correspondants)

	Albumine		Alpha1 Globulines		Alpha2 Globulines		Béta Globulines		Gamma Globulines	
	S (n = 33)	(S+P) (n = 33)	S (n = 33)	(S+P) (n = 33)	S (n = 33)	(S+P) (n = 33)	S (n = 33)	(S+P) (n = 33)	S (n = 33)	(S+P) (n = 33)
Moyenne ± Ecart-type (%)	51,06 ± 5,72	50,83 ± 6,08	3,88 ± 1,23	3,75 ± 1,22	14,12 ± 3,37	13,12 ± 2,74	13,01 ± 2,36	16,51* ± 2,51	17,93 ± 5,03	15,76** ± 4,76

S : sérum ; (S+P) : Sérum + plasma correspondant.

* : p < 0,0001

** : p = 0,038

Tableau II : Comparaison des profils protéiques des sérums purs avec ceux traités à la thrombine et à l'éthanol

	Albumine			Alpha1 Globulines			Alpha2 Globulines			Béta Globulines			Gamma Globulines		
	S (n = 30)	STE (n = 30)	STT (n = 30)	S (n = 30)	STE (n = 30)	STT (n = 30)	S (n = 30)	STE (n = 30)	STT (n = 30)	S (n = 30)	STE (n = 30)	STT (n = 30)	S (n = 30)	STE (n = 30)	STT (n = 30)
Moyenne ± Ecart-type (%)	52,5 ± 4,56	53,18 ± 5,3	54,29 ± 4,8	3,46 ± 0,88	3,48 ± 0,97	3,29 ± 0,93	13,26 ± 2,34	15,15* ± 2,75	13,36 ± 2,39	13,34 ± 2,23	10,58** ± 1,9	12,52 ± 2,26	17,44 ± 5,23	17,49 ± 5,43	16,56 ± 4,89

S : sérum

STE : sérum traité à l'éthanol

STT : sérum traité à la thrombine

* : p = 0,002

** : p < 0,0001

Tableau III : Pourcentages des fractions béta avant et après traitement à la thrombine et à l'éthanol

	S non traité (n = 33)	(S+P) non traité (n = 33)	(S+P) Traité à la thrombine (n = 33)	(S+P) Traité à l'éthanol (n = 33)
Moyenne ± Ecart-type (%)	13,01 ± 2,36	16,51 ± 2,51	12,75 ± 2,5	12,28 ± 2,33
p			< 0,0001* 0,1***	< 0,0001** 0,33****

S : sérum ; (S+P) : mélange sérum + plasma

* : (S+P) traité à l'éthanol comparé à (S+P) non traité

** : (S+P) traité à la thrombine comparé à (S+P) non traité

*** : (S+P) traité à l'éthanol comparé à (S) non traité

**** : (S+P) traité à la thrombine comparé à (S) non traité

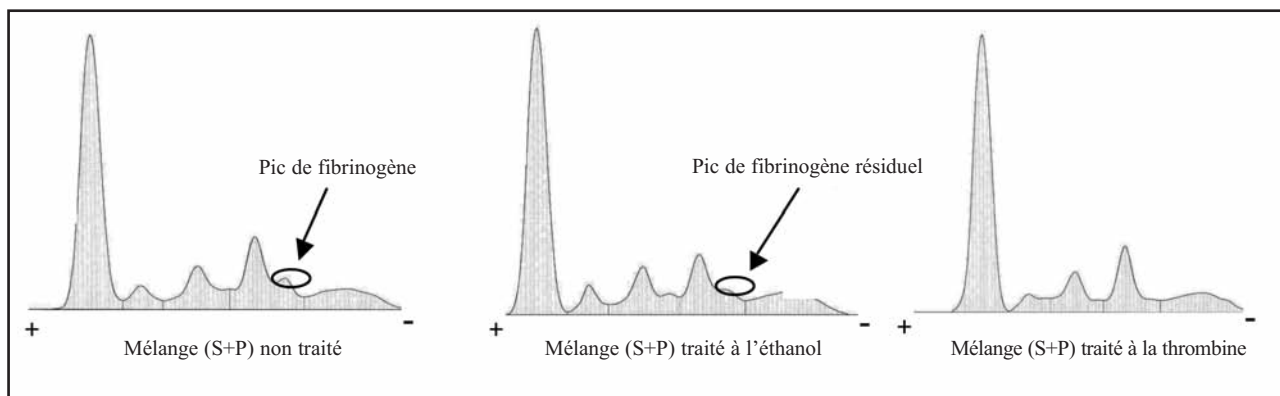


Figure 2 : Exemple de l'effet des traitements à l'éthanol et à la thrombine sur l'élimination du pic de fibrinogène

béta globulines ramenant les profils à ceux obtenus avec du sérum pur. En effet aucune différence significative n'a été constatée entre les fractions bêta des sérums purs et celles de leurs correspondants (S+P) traités à l'éthanol et à la thrombine ($P = 0,10$; $P = 0,33$ respectivement). Cette diminution de la fraction des bêta globulines est de 4,27% après traitement à l'éthanol et de 3,79% après traitement à la thrombine (tableau III).

Toutefois, nous avons noté que malgré une diminution significative de la fraction bêta, le traitement à l'éthanol ne fait pas tout le temps disparaître totalement le pic de fibrinogène. En effet, un pic résiduel a été constaté dans 18 échantillons sur les 30 étudiés (figure 2).

Discussion

La présence dans les prélèvements sériques de fibrinogène résiduel, donne une bande mince à l'électrophorèse des protéines qui migre entre les fractions bêta et gammaglobulines et qui est du même aspect que donne une authentique dysglobulinémie monoclonale.

Le prélèvement du sang sur tube sans anticoagulant, permet en théorie de s'affranchir de la présence de fibrinogène ; cependant, la pratique courante montre que certaines conditions tenant soit au traitement du patient, soit aux conditions de prélèvement (certains matériaux des tubes de prélèvements...), peuvent conduire à des interférences liées à la présence de fibrinogène résiduel : traitement anticoagulant provoquant une coagulation

incomplète dans le tube, désordre acquis de coagulation, dysfibrinogénémie congénitale, déficit en vitamine K... Nous avons comparé deux procédures d'élimination du fibrinogène, par l'éthanol qui le précipite (5) et par la thrombine qui le transforme en un caillot de fibrine.

Comme d'autres études, nous avons révélé la présence du pic de fibrinogène entre les fractions bêta et gamma globulines, ce qui augmente significativement la fraction des bêta globulines (16,51 vs 13,01% ; $P < 0,0001$) (2,3,6).

Nous avons noté que le traitement à l'éthanol des échantillons sériques, modifie la distribution des fractions protéiques des profils électrophorétiques en augmentant la fraction des alpha2 globulines (13,26 vs 15,15% ; $P = 0,002$) et en diminuant celle des bêta globulines (13,34 vs 10,58% ; $P < 0,0001$). L'éthanol ne semble pas précipiter sélectivement le fibrinogène malgré ce qui a été avancé par Qiu et al (3) qui ont mis au point ce protocole. Les mêmes auteurs proposent un autre protocole qui donne les mêmes résultats et qui au lieu d'une incubation pendant une nuit à +4°C, préconise de mettre l'échantillon en contact avec l'éthanol pendant 15min dans un bain de glace. Les auteurs de cette étude ont tout de même reconnu que de petites proportions d'albumine, d'alpha et de bêta globulines pourraient précipiter sous l'effet de l'éthanol tandis que les immunoglobulines IgG, IgA, IgM, et les fractions C3 et C4 du complément restent inchangées (3). Nos résultats concordent avec ceux de Zhu et al (6) qui ont postulé que la diminution de la fraction bêta serait due à la

dégradation par l'éthanol de la protéine C3 (une bêta globuline) et les produits de dégradation migrent ensuite au niveau de la jonction bêta-alpha2, ce qui expliquerait l'élévation de la fraction alpha2 protéique. Ibrahim et al (4) ont fait migrer les précipités correspondants aux échantillons traités à l'éthanol et ont noté en plus du fibrinogène, la présence d'autres fractions protéiques ce qui explique la modification dans la distribution des fractions protéiques sur les profils électrophorétiques traités à l'éthanol. Nous n'avons noté aucune modification dans les profils électrophorétiques après traitement à la thrombine malgré que ce soit une protéine.

Nous avons trouvé que les traitements à l'éthanol ou à la thrombine des sérums supplémentés en fibrinogène (mélanges S+P) diminuent significativement la fraction des bêta globulines qui retrouve des pourcentages comparables à ceux des sérums purs correspondants. Cette fraction bêta est plus diminuée après traitement à l'éthanol qu'après traitement à la thrombine (4,27 vs 3,79% ; P = 0,12) puisqu'en plus de l'élimination du fibrinogène, l'éthanol affecte d'autres protéines migrant au niveau de cette zone, ce qui concorde avec ce que nous avons rapporté sur l'effet de l'éthanol sur la distribution des fractions protéiques et sur le fait qu'il diminue la fraction bêta des échantillons sériques. Toutefois, nous avons noté que malgré une diminution significative de la fraction bêta, le traitement à l'éthanol diminue l'ampleur du pic de fibrinogène sans le faire régulièrement disparaître.

Nos résultats sont comparables à ceux rapportés par Zetterberg et al (7) qui jugent que le traitement à l'éthanol est non reproductible dans l'action de faire disparaître le pic de fibrinogène des échantillons sériques. Tandis que, comme l'ont rapporté Lefèvre et al (2), le traitement à la thrombine fait disparaître le pic de fibrinogène sans modifier la répartition des fractions protéiques et semble ainsi être le plus recommandé.

Conclusion

Au vu des résultats de notre étude, nous recommandons le traitement à la thrombine pour l'élimination des pics de fibrinogène puisqu'elle les fait disparaître sans toute-

fois affecter la distribution des fractions protéiques d'un profil électrophorétique sérique. La thrombine pourrait être apportée au sérum après centrifugation, sinon, actuellement, des tubes avec thrombine qui éliminent le fibrinogène à l'intérieur même des tubes de prélèvement, sont commercialisés.

Références bibliographiques

1. Martinez-Subiella S, Tecles F, Montes A, Gutierrez C, Ceron J.J. Effects of haemolysis, lipaemia, bilirubinemia and fibrinogen on protein electrophoregram of canine samples analysed by capillary zone electrophoresis. *Vet J* 2002 ; 164 : 261-68.
2. Lefèvre F, Gillery P. Présence résiduelle de fibrinogène: un piège fréquent dans l'interprétation de l'électrophorèse des protéines sériques. *Ann Biol Clin* 1997 ; 55 : 238-40.
3. Qiu L, Levinson SS, Keeling KL, Elin RJ. Convenient and effective method for removing fibrinogen from serum specimens before protein electrophoresis. *Clin Chem* 2003 ; 49: 868-72.
4. Ibrahim Y, Volkmann M, Hassoun R, Fiehn W, Rossmann H. Serum protein electrophoresis : reptilase treatment is superior to ethanol precipitation for specific removal of fibrinogen from heparinized plasma samples. *Clin chem* 2004; 50: 1100- 101.
5. Cohn EJ, Srong LE, Hughes WL Jr, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M et al. Preparation and properties of serum and plasma proteins : IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc* 1946 ; 68 : 459-75.
6. Zhu Y, Elin RJ. Identification of a spurious band on serum protein electrophoresis induced by ethanol treatment. *Clin Chim Acta* 2006; 366: 341-43.
7. Zetterberg H, Nilsson-Ehle H. Ethanol precipitation is not reliable for selectively removing nonmonoclonal peaks seen in the fibrinogen region on capillary zone electrophoresis of serum proteins. *Clin Chem* 2004 ; 50 : 1880-81.