



Didier Le Carrer, Kalyane Bach-Ngohou*

L'électrophorèse capillaire automatisée en biologie clinique

RÉSUMÉ

L'électrophorèse de zone est utilisée dans les laboratoires de biologie médicale depuis une soixantaine d'années pour séparer et identifier les protéines sériques. Initialement réalisée sur acétate de cellulose et par des techniques manuelles, elle utilise aujourd'hui très majoritairement les gels d'agarose et peut être automatisée. Sur certains analyseurs polyvalents, d'autres types d'examen lui sont associés, comme l'électrophorèse des protéines (sérum, urine, LCR), de l'hémoglobine, des lipides ou des isoenzymes, ainsi que l'immunofixation des protéines sériques et urinaires. D'apparition plus récente (en 1994 pour la première génération d'automate, le Paragon CZE 2000® - Beckman Coulter), l'électrophorèse capillaire de zone est une véritable innovation technique dans le domaine de la biologie clinique. C'est une méthode de séparation analytique très performante et parfaitement adaptée à la routine d'un laboratoire. Rapide, quantitative et reproductible, elle permet en quelques minutes l'analyse d'un micro-échantillon prélevé sur un tube primaire identifié par un code à barre intégré. La seconde génération d'automate est représentée par le Capillarys® - Sebia. Commercialisé en 2001, il bénéficie des derniers développements analytiques dans ce domaine et fait l'objet de cet article.

MOTS CLÉS

Electrophorèse capillaire, Capillarys®, protéinogramme, gammopathies monoclonales, néphélométrie.

Automatised capillary zone electrophoresis in clinical biology

SUMMARY :

For the separation and the identification of serum proteins, zone electrophoresis is routinely used by biological laboratories since the 1940's, primarily by manual technique on cellulose acetate support and now automatically on agarose gel. Using some polyvalent analysers, serum and urinary protein immunofixation, urinary proteins, cerebrospinal fluid, hemoglobin, lipids or isoenzyme electrophoresis can also be done. Discovered more recently (1994, first generation, Paragon CZE 2000® - Beckman Coulter), automated capillary zone electrophoresis constitutes a real technical advance in the field of routine clinical diagnostics. Fast, quantitative and reproducible, it requires only a few minutes to make numerous analysis in a small amount of sample drawn on primary tube identified by integrated barcode. These second generation of analysers is represented by the Capillarys® (Sebia). Commercialised since 2001, it benefits of the more recent analytical development in this field and constitutes the subject of this article.

KEYWORDS

Capillary electrophoresis, Capillarys®, proteinogram, monoclonal gammopathies, nephelometry.

I – Introduction

L'électrophorèse capillaire est une microtechnique destinée à l'analyse qualitative et quantitative de solutions complexes, à partir d'échantillons de très faible volume. C'est une miniaturisation de l'électrophorèse en veine liquide initialement décrite par Tiselius dans les années 1930. Elle permet notamment une séparation rapide de molécules organiques de masse moléculaire et de structure très

variées telles que les sucres, les lipides, les peptides et les protéines (1). Si les applications de l'électrophorèse capillaire furent pendant longtemps limitées aux laboratoires de recherche, l'apparition en 1994 d'un système automatisé parfaitement adapté à la séparation rapide des protéines sériques a constitué une véritable innovation technique dans le domaine de la biologie clinique. Cette première génération d'analyseurs, représentée par le Paragon CZE 2000® (Beckman-Coulter), est venue

* Laboratoire de Biochimie Spécialisée - Centre Hospitalier Universitaire - 9 quai Moncouso - 44093 - Nantes Cedex 1 - Tél. : 02 40 08 40 10 - Fax : 02 40 08 39 91
E-Mail : didier.lecarrer@chu-nantes.fr

Technique

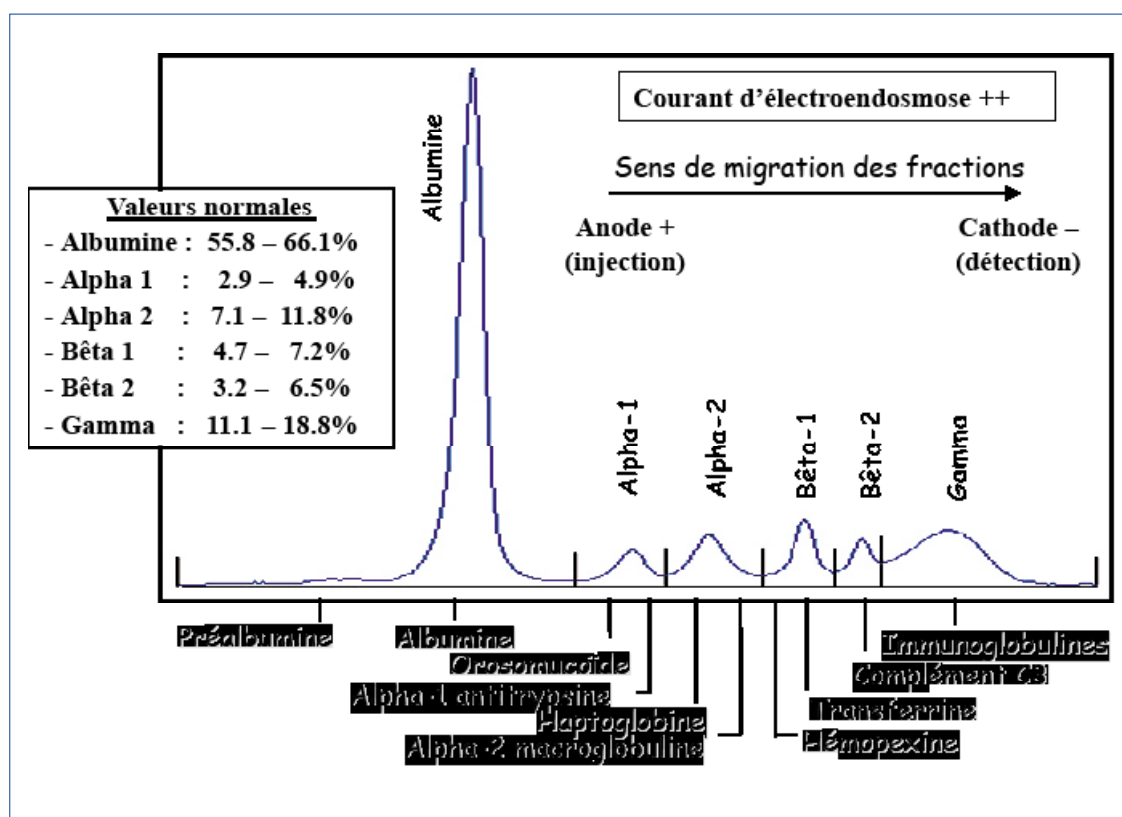


Figure 1
Valeurs normales en pourcentages et identification des fractions protéiques en électrophorèse capillaire sur Capillarys® Sebia (tampon Protéine 6).

s'enrichir en 2001 d'un automate de seconde génération, le Capillarys® (Sebia). Initialement conçu pour l'électrophorèse capillaire des protéines sériques, les applications de ce dernier automate se sont étendues en 2005 à l'immunotypage des immunoglobulines (Ig) monoclonales, à la détermination de la transferrine désialylée et à l'analyse des hémoglobines.

II – Caractéristiques analytiques et intégration dans le laboratoire

Le Capillarys® est un analyseur dont le principe est l'électrophorèse capillaire de zone en veine liquide. Réalisée dans un tampon de pH = 10, sous un voltage élevé de 7000 volts, la migration est contrôlée par effet Peltier à 35,5 °C, ce qui évite les problèmes éventuels liés à certaines cryoglobulines susceptibles de précipiter à température ambiante (2). La migration s'effectue en parallèle dans huit tubes capillaires de silice fondue (diamètre : 25 µm, longueur : 18 cm) protégés par une gaine en aluminium. Le système optique est constitué d'une lampe au deutérium, la cellule de détection comporte un filtre UV à 200 nm (longueur d'onde d'absorption des liaisons peptidiques). L'alimentation des échantillons se fait en continu, avec identification des tubes primaires par un code à barre intégré. Le pilotage de l'automate s'effectue grâce à un logiciel multitâches sous Windows. La cadence de l'automate est de 80 tests/heure, le tracé apparaissant sur l'écran une dizaine de minutes après l'introduction de l'échantillon. Son intégration à l'organisation du laboratoire a permis le transfert sur Capillarys® des électrophorèses des protéines sériques (40 à 120 dossiers/jour) jusqu'alors réalisées de façon semi-automatisée sur un Hydrasys® (Sebia) couplé à un densitomètre Hyrys 2® (Sebia).

III - Interprétation des résultats

La séparation des protéines sériques par électrophorèse capillaire comporte 6 zones dont les valeurs normales ont été établies par le fournisseur : albumine, α1, α2, β1, β2, et γ-globulines (figure 1). En raison du fort courant d'électroendosmose, le sens de migration des fractions protéiques est inversé par rapport au gel d'agarose. L'injection se fait à l'anode, la détection UV à la cathode et les γ-globulines sont la première fraction détectée. Pour le biologiste, l'interprétation des tracés ne pose pas de problème majeur après un rapide apprentissage. Un élément déstabilisant au départ est toutefois l'absence de support « matériel », les gels d'agarose permettant en effet un contrôle visuel de cohérence avec le tracé (notamment en cas de bandes monoclonales), ce qui n'est plus possible en électrophorèse capillaire. Pour le clinicien, un élément rassurant est la grande similitude du tracé par rapport à celui obtenu par intégration des gels d'agarose séparant également les zones β1 et β2. Si l'interprétation d'un tracé d'électrophorèse capillaire des protéines est très proche de celle du tracé obtenu après intégration d'un gel d'agarose, quelques particularités propres à chacune des six zones analysées doivent toutefois être connues par le biologiste, comme certaines interférences analytiques spécifiques à l'électrophorèse capillaire.

1. Zone de l'albumine

Au niveau quantitatif, les valeurs normales en pourcentage de la fraction albumine sont plus faibles en électrophorèse capillaire (55,8-66,1%) qu'en gel d'agarose (60-71%). Il existe une excellente concordance entre la quantification en g/L de la zone albumine (calculée à partir de son pourcentage et de la protidémie) et le dosage néphélométrique de l'albumine, et

L'électrophorèse capillaire automatisée en biologie clinique

ceci même dans les valeurs basses (10 g/L) ou élevées (50 g/L). Une réserve doit toutefois être faite pour les sérums dont l'électrophorèse présente un pic monoclonal important. La proportion élevée d'Ig monoclonale surévalue en effet le dosage des protéines totales par la technique du biuret et surestime donc secondairement l'appréciation sur l'électrophorèse de l'albumine calculée à partir du pourcentage et de la protidémie (voir V – Corrélations avec la néphélométrie).

Au niveau qualitatif, la détection des bisalbuminémies est meilleure en électrophorèse capillaire (3, 4). Cette technique plus sensible permet même dans certains cas de révéler cette anomalie passée inaperçue en électrophorèse classique sur gel d'agarose (*figure 2*).

2. Zone des alpha1-globulines

Au niveau quantitatif, les valeurs normales en pourcentage de la zone $\alpha 1$ (où migrent l' $\alpha 1$ -an-

titrypsine et l'orosomucoïde) sont deux fois plus élevées en électrophorèse capillaire (2,9-4,9 %) qu'en gel d'agarose (1,4-2,9 %) (5). Cette différence s'explique par la forte proportion en acide sialique de l'orosomucoïde qui diminue la fixation des colorants (tel l'amidoschwartz) sur les gels d'agarose, alors qu'en électrophorèse capillaire l'absorption dans l'UV n'est pas affectée par ces sucres. Le pourcentage obtenu par cette dernière technique reflète donc mieux la réalité (6). En contre partie, certains déficits modérés en $\alpha 1$ -antitrypsine peuvent passer inaperçus en cas d'augmentation de l'orosomucoïde (inflammation) et il n'y a pas de corrélation démontrée entre l'appréciation en g/L de la zone $\alpha 1$ en électrophorèse capillaire et le dosage néphélométrique de l' $\alpha 1$ -antitrypsine (7).

Au niveau qualitatif, certains variants de l' $\alpha 1$ -antitrypsine (phénotypes hétérozygotes) peuvent être détectés en électrophorèse capillaire grâce à l'aspect dédoublé ou inhabituel de la zone $\alpha 1$ (8). Une concentration sérique abaissée de l' $\alpha 1$ -antitrypsine et la détermination de son phénotype Pi complèteront obligatoirement l'exploration biochimique de cette anomalie génétique.

3. Zone des alpha 2-globulines

Au niveau quantitatif, la zone $\alpha 2$, estimée en g/L à partir de son pourcentage et de la protidémie, est deux fois supérieure à la somme des dosages néphélométriques de l'haptoglobine et de l' $\alpha 2$ -macroglobuline (par ailleurs fréquemment demandés chez les patients atteints d'hépatite C dans le cadre du Fibrotest®). Lors d'une inflammation aiguë, le pourcentage de la zone $\alpha 2$ est toujours supérieur à celui de la zone $\alpha 1$. En cas de discordance (zone $\alpha 2$ inférieure à la zone $\alpha 1$), une hémolyse intravasculaire abaissant l'haptoglobine peut être évoquée, de la même façon que pour une électrophorèse sur agarose. Au niveau qualitatif, la zone $\alpha 2$ présente habituellement en électrophorèse capillaire un seul pic correspondant à la superposition de l'haptoglobine et de l' $\alpha 2$ -macroglobuline (2). Selon le phénotype de l'haptoglobine, la zone $\alpha 2$ peut parfois comporter un épaulement ou un dédoublement plus ou moins accentué du pic en cas de phénotype 1-2 ou 1-1 (*figure 3*) (9). Cette particularité, spécifique à l'électrophorèse capillaire, est sans signification pathologique directe en biologie clinique. En raison de sa fréquence significative dans la population générale, elle peut parfois conduire à négliger la présence d'un éventuel pic surnuméraire monoclonal de migration $\alpha 2$.

4. Zone des bêta 1-globulines

Au niveau quantitatif, une augmentation de la zone $\beta 1$ peut évoquer une hypertransferrinémie (anémie ferriprive), alors qu'une diminution sera fréquemment associée à une hypotransferrinémie (syndrome inflammatoire, insuffisance hépatique, fuite urinaire). Au niveau qualitatif, la séparation nette de la zone $\beta 1$ facilite la détection des compo-

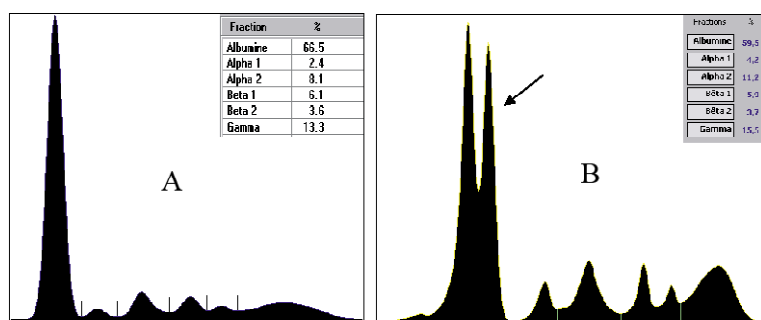
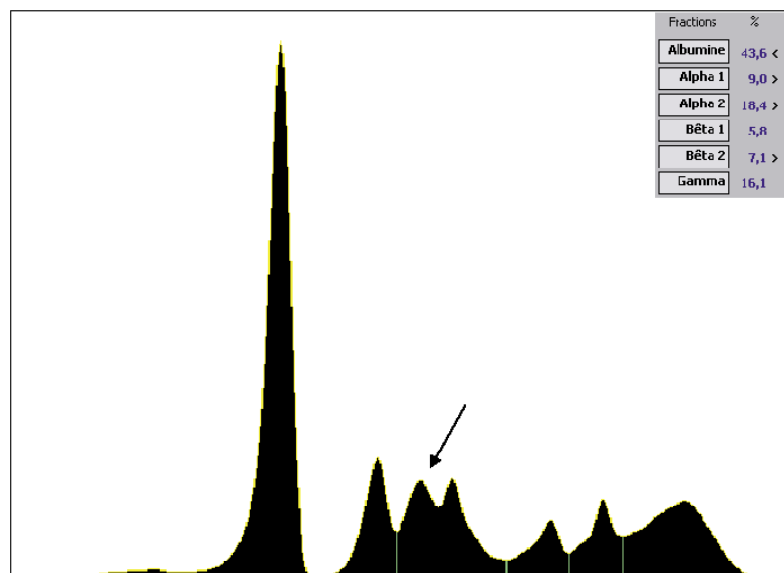
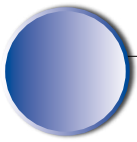


Figure 2
Electrophorèse sur gel d'agarose (A) et électrophorèse capillaire (B) du même sérum. La bisalbuminémie n'est visible qu'en électrophorèse capillaire.

Figure 3
Dédoublément de la zone des $\alpha 2$ -globulines évocateur d'un phénotype 1-1 de l'haptoglobine.





sants monoclonaux migrant à ce niveau (Ig complète ou/et chaînes légères libres).

5. Zone des bêta 2-globulines

Au niveau quantitatif, une augmentation de la zone β_2 , en l'absence d'hémolyse, doit évoquer une hypercomplémentémie C3 (inflammation, cholestase), alors qu'une diminution sera associée à une hypocomplémentémie C3 (sérum vieilli, consommation du complément par la voie classique ou alterne). Au niveau qualitatif, tout comme pour la zone β_1 , la séparation nette de la zone β_2 facilite la détection des composants monoclonaux migrant à ce niveau (Ig complète ou/et chaînes légères libres).

6. Zone des gamma-globulines

Au niveau quantitatif, il existe une bonne concordance entre la zone γ et le dosage néphélométrique des IgG, même dans les valeurs basses (2 g/L) ou élevées (40 g/L). Ceci n'est toutefois pas valable lorsqu'il existe un pic monoclonal important ou un bloc bêta-gamma (voir V – Corrélations avec la néphélométrie). Au niveau qualitatif, l'électrophorèse capillaire permet la visualisation des profils oligoclonaux (aspect « multi-bandes ») dans la zone des γ -globulines (figure 4). La limite de détection d'une Ig monoclonale dans la zone γ peut varier selon les cas de 0,20 à 0,75 g/L selon qu'il existe une hypo ou une hypergammaglobulinémie polyclonale associée (2, 10). Certains composants monoclonaux ne sont pas quantifiables sur gel d'agarose et ne sont détectables qu'en électrophorèse capillaire. Il s'agit d'IgM très polymérisées qui précipitent dans le gel ou peuvent adhérer à la membrane poreuse de l'aplicateur (11). A l'inverse et dans de très rares cas, certaines Ig monoclonales (de type IgG ou IgM) migrent en électrophorèse capillaire en dehors de la fenêtre de captation et ne sont détectables qu'en gel d'agarose (12). L'utilisation d'un traitement réducteur au mercaptoéthanol améliore nettement la détection de certaines IgM monoclonales en électrophorèse capillaire (13).

7. Interférences biologiques communes aux deux techniques

En présence d'un sérum hémolysé, la zone α_2 peut être déformée en raison de la présence du complexe [haptoglobine-hémoglobine] migrant à ce niveau, et la zone β_1 augmentée à cause de l'hémoglobine libre éventuellement présente. Lorsqu'il existe un reliquat de fibrinogène (analyse d'un plasma ou du sérum d'un patient sous traitement anticoagulant) un pic surnuméraire apparaît au début de la zone γ , simulant un pic monoclonal. Enfin, si la concentration de la C-réactive protéine est élevée (supérieure à 300 mg/L) un petit pic surnuméraire est visible dans la zone γ , en particulier s'il existe une hypogammaglobulinémie (10).

8. Interférences médicamenteuses spécifiques à l'électrophorèse capillaire

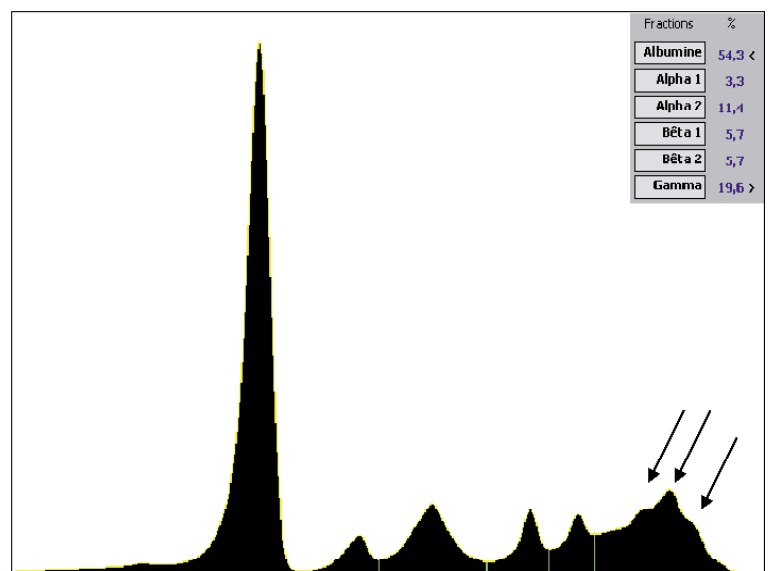
Un certain nombre de substances absorbant dans l'UV vers 200 nm peuvent majorer le pourcentage de certaines zones et/ou donner des pics surnuméraires en électrophorèse capillaire. Ces interférences, initialement décrites pour le Paragon 2000[®] (14, 15), existent également pour le Capillarys[®]. Il s'agit essentiellement de :

- la vitamine B12 (majoration de la zone α_1) ;
- certains produits de contraste iodés (pics surnuméraires en zones α_2 , β_1 ou β_2) ;
- les substituts plasmatiques à base de gélatine (majoration de la zone γ) ;
- et les immunoglobulines polyvalentes intra-veineuse (majoration de la zone γ).

IV - Gestion qualité

Le logiciel de gestion qualité de cet automate est très convivial. Il permet d'avoir une bonne traçabilité du lot des réactifs utilisés, ces derniers pouvant être visualisables sur l'écran lors de l'affichage des niveaux de réactifs ainsi que lors de la consultation d'un dossier patient. De la même façon, les contrôles de qualité à 2 niveaux peuvent être facilement analysés sur des graphiques de Levey-Jennings. Ils présentent des variations d'environ un écart-type autour de la valeur-cible pour chacune des 6 zones. A partir de ces graphiques il est possible d'obtenir les statistiques du laboratoire pour chaque niveau de contrôle, notamment le coefficient de variation (CV) et l'exactitude. Pour toutes les zones nous avons retrouvé un CV inférieur à 5 %. En pratique quotidienne, il est possible d'effectuer une édition condensée des courbes d'électrophorèse en fin de journée avant l'archivage informatique sur le disque dur de l'automate. Ces deux fonctions sont tout à fait conformes aux recommandations du GBEA sur l'archivage des dossiers biologiques au laboratoire.

Figure 4
Profil oligoclonal de la zone des γ -globulines (aspect multi-bandes)



V - Corrélations avec la néphélométrie

Il existe une très bonne corrélation entre les valeurs en g/L de certaines fractions de l'électrophorèse (en particulier l'albumine et les γ -globulines) et les dosages néphélométriques des protéines correspondantes (albumine et IgG). Sur une année (n = 1481 patients), nous avons ainsi observé une corrélation significative entre l'albuminémie estimée par électrophorèse capillaire et dosée par néphélométrie ($r=0.94$, $p<10^{-4}$) (figure 5). Cependant, dans certains cas (n = 65), nous avons constaté que l'albuminémie dosée par néphélométrie pouvait être inférieure (jusqu'à 15 g/L) à l'albuminémie calculée par électrophorèse capillaire (figure 5, zone entourée). Notre expérience nous a montré qu'il s'agissait majoritairement dans ce cas de patients présentant une gammopathie monoclonale à IgG et pour lesquels l'albuminémie estimée par électrophorèse capillaire est erronée. Une différence supérieure à 6 g/L est observée à chaque fois que la zone des γ -globulines est supérieure à 45 %.

L'albuminémie étant souvent un critère décisionnel majeur en thérapeutique, nous conseillons aux cliniciens pour toute électrophorèse montrant une zone gamma supérieure à 45 % de ne tenir compte que de l'albuminémie dosée par néphélométrie. Nous avons également observé une très bonne corrélation entre la zone gamma et les IgG ($r=0,87$, $p<10^{-4}$) (figure 6). Quatre zones sont cependant discordantes et peuvent être facilement individualisées :

- la première (a) correspond à la présence d'IgG monoclonales migrant en zone bêta,
- la deuxième (b) aux hyper gamma-globulinémies polyclonales avec bloc bêta-gamma,
- la troisième (c) à la présence d'une gammopathie monoclonale de type IgA ou IgM, ou à une interférence due à un soluté de remplissage migrant en zone gamma,
- la quatrième zone (d) illustre la surestimation

des dosages néphélométriques d'IgG en cas de pics monoclonaux importants. Il faut dans ce cas préférer les valeurs estimées par l'électrophorèse.

Une bonne corrélation est également observée entre les valeurs des zones $\beta 1$ et $\beta 2$ de l'électrophorèse et les dosages néphélométriques de la transferrine et de la fraction C3 du complément. Toutefois, dans ces deux cas, les valeurs de l'électrophorèse capillaire sont toujours significativement supérieures à celles de la néphélométrie.

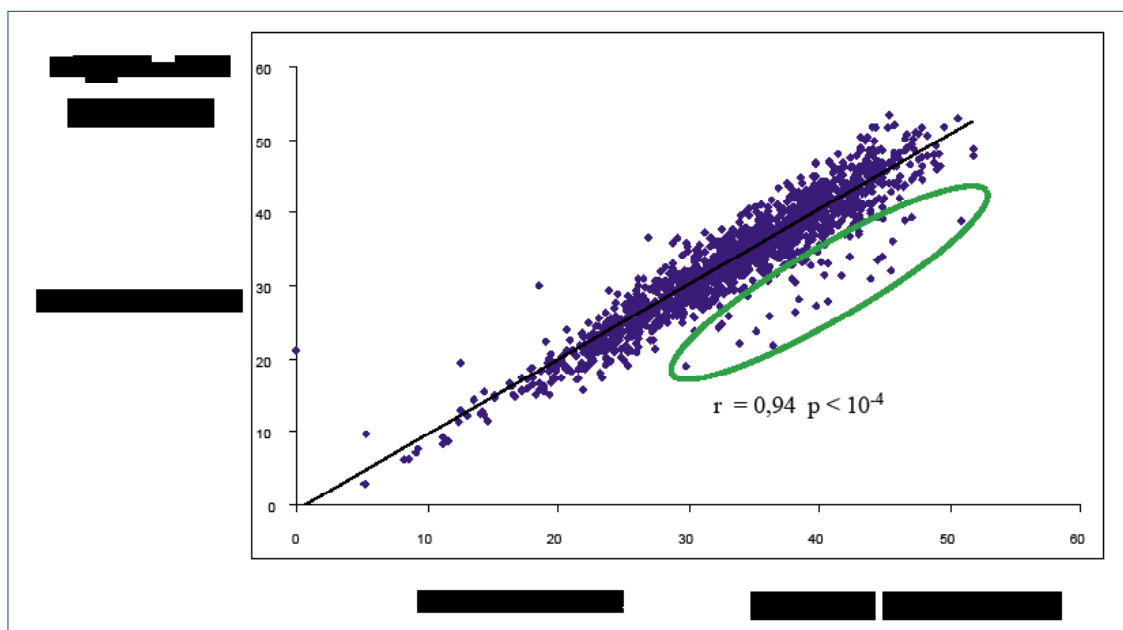
VI – Autres applications

Comme nous l'avons évoqué au début de cet article, les applications analytiques du Capillarys® se sont étendues en 2005. C'est ainsi qu'une séparation plus fine des protéines sériques par électrophorèse haute résolution est maintenant proposée, permettant de séparer chacune des zones en plusieurs pics. La zone $\alpha 1$ est séparée en orosomucoïde et $\alpha 1$ -antitrypsine, et la zone $\alpha 2$ en $\alpha 2$ -macroglobuline et haptoglobine. L'immunotypage des gammopathies monoclonales est également accessible sur cet automate, permettant un gain de temps appréciable en remplaçant dans certains cas l'immunofixation. Plus récemment, la détermination de la transferrine désialylée et l'électrophorèse des hémoglobines ont également été proposées.

VII – Conclusion

L'électrophorèse capillaire de zone est représentée aujourd'hui par des automates qui répondent aux contraintes de simplicité, performance, flexibilité, cadence, robustesse, standardisation, traçabilité et coût imposés par l'environnement d'analyse de routine. Ces caractéristiques se retrouvent notamment sur les automates de dernière génération représentés en 2005 par le Capillarys®. La détec-

Figure 5
Corrélation entre l'albumine dosée ALBn (BN II® Dade Behring) et l'albumine calculée ALBc. La zone entourée correspond à la majorité des points discordants



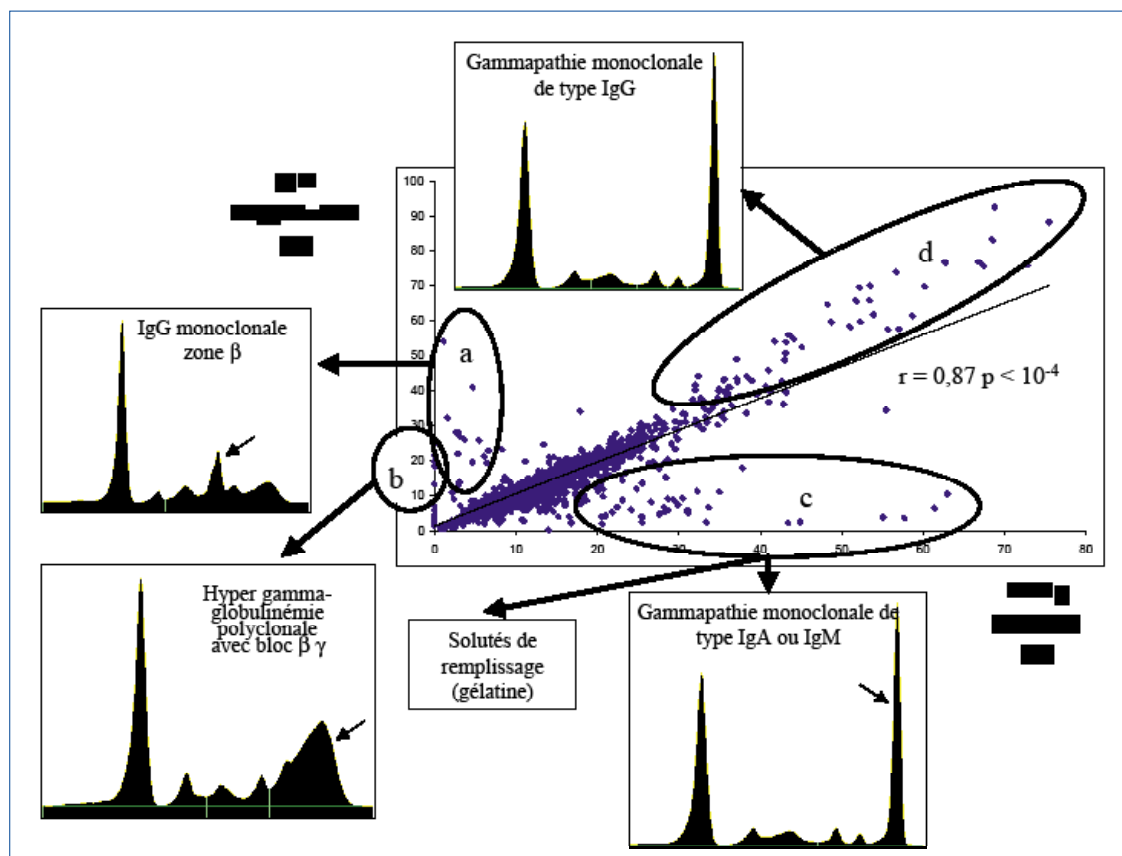


Figure 6
Corrélation entre les IgG dosées (BN II[®] Dade Behring) et la zone des γ -globulines en électrophorèse capillaire (calculée à partir de la protidémie et du pourcentage). Les quatre zones individualisées a b c d regroupent les principaux dossiers discordants et les tracés électrophorétiques correspondants.

tion en ligne permet une analyse fiable et reproductible des échantillons, et les volumes de sérum utilisés sont minimes. De plus, la simplicité d'utilisation, de formation et de maintenance ainsi que la faible consommation en réactifs (quelques microlitres par échantillon) réduisent au maximum les coûts d'exploitation, en particulier pour les laboratoires qui réalisent de grandes séries. Certaines fractions protéiques (albumine,

γ -globulines) sont bien corrélées aux dosages néphéléométriques et permettent une approche analytique véritablement quantitative. L'interprétation du tracé capillaire diffère peu de celui obtenu après intégration des gels d'agarose, mais il demande toutefois au biologiste de connaître quelques spécificités, en particulier ce qui concerne les interférences analytiques.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) FEUILLOTEY M.G.J., MERIEAU A., ORANGE N. Applications biomédicales de l'électrophorèse capillaire. *M/S*, 1999, **15**, 1419-1426.
- (2) BOSSUYT X. Separation of serum proteins by automated capillary zone electrophoresis. *Clin Chem Lab Med*, 2003, **41**(6), 762-772.
- (3) BACH-NGOHOU K., SCHMITT S., LE CARRER D., MASSON D., DENIS M. Les dysalbuminémies. *Ann Biol Clin*, 2005, **63**(2), 127-134.
- (4) JAEggi-GROISMAN S.E., BYLAND C., GERBER H. Improved sensitivity of capillary electrophoresis for detection of bisalbuminemia. *Clin Chem* 2000, **46**(6), 882-883.
- (5) LISSOIR B, WALLEMACQ P, MAISIN D. Serum protein electrophoresis : comparison of capillary zone electrophoresis Capillarys (Sebia) and agarose gel electrophoresis Hydrasys (Sebia), *Ann Biol Clin*. 2003, **61**, 557-562.
- (6) BOSSUYT X, LISSOIR B, MARIEN G, MAISIN D, VUNCK J, BLANCKAERT N, WALLEMACQ P. Automated serum protein electrophoresis by Capillarys®, *Clin Chem Lab Med*. 2003, **41**(5), 704-710.
- (7) GONZALEZ-SAGRADO M., LOPEZ-HERNANDEZ S., MARTIN-GIL F.J., TASENDE J., BANUELOS M.C., FERNANDEZ-GARCIA N., ARRANZ-PENA M.L. Alpha1-antitrypsin deficiencies masked by a clinical capillary electrophoresis system (CZE 2000). *Clin Biochem*. 2000, **33**(1), 79-80.
- (8) FORAY V., CHAPUIS-CELLIER C. Dépistage des variants génétiques de l'alpha-1 antitrypsine par électrophorèse capillaire sur Paragon CZE 2000®. *Imm Bio Spéc*, 2004, **19**, 117-120.
- (9) GUEYE P.M., SALL I., LESSINGER J.-M., FERARD G. Interférence de l'hémolyse sur la détermination de l'haptoglobine en immunonéphélométrie cinétique et comparaison selon les phénotypes. *Ann Biol Clin*, 2004, **62**, 701-705.
- (10) GAY-BELLILE C, BENGOUFA D, HOUZE P, LE CARRER D, BENLAKELAL M, BOUSQUET B, GOURMEL B, LE BRICON T. Automated multicapillary electrophoresis for analysis of human serum proteins. *Clin Chem*, 2003, **49**, 1909-1915.
- (11) BOSSUYT X., MARIEN G. False-negative serum protein electrophoresis in a sample with an IgM monoclonal protein by semi-automated gel electrophoresis. *Clin Chem*, 2005, **51**(1), 270-271.
- (12) BOSSUYT X., MARIEN G. False-negative results in detection of monoclonal proteins by capillary zone electrophoresis : a prospective study. *Clin Chem*, 2001, **47**(8), 1477-1479.
- (13) KEREN D.F., GULBRANSON R., CAREY J.L., KRAUSS J.C. 2-Mercaptoethanol treatment improves measurement of an IgM kappa M-protein by capillary electrophoresis. *Clin Chem*, 2001, **47**(7), 1326-1327.
- (14) BOSSUYT X. Interferences in clinical capillary zone electrophoresis of serum proteins. *Electrophoresis*, 2004, **25**, 1485-1487.
- (15) GIJBELS K., DE COSTER J., BOSSUYT X. Interferences by gelatin-based plasma substitutes in capillary zone electrophoresis. *Clin Chem*, 2004, **50**(8), 1473-1474.