

INTERVALLES DE REFERENCE POUR LES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DES PROTEINES TOTALES, FRACTIONS PROTEIQUES, ET RATIO ABUMINE/GLOBULINES CHEZ DES POULETS ET DES DINDES ADULTES

Arzour- Lakehal. Nedjoua^{1*}, Boudebza. Assia¹, Jaillardon. Laititia², Benlatrèche. Chérifa³

¹laboratoire PADESCA. ISV El khroub. Université des frères Mentouri. Constantine. Algérie.

²LDH vet. ONIRIS. Nantes. France.

³Laboratoire de Biochimie. CHU Benbadis. Constantine. Algérie.

arzourne@gmail.com

RÉSUMÉ

L'électrophorèse des protéines est utilisée en médecine aviaire en tant que moyen diagnostique depuis une quinzaine d'années principalement dans le diagnostic de phénomènes inflammatoires. L'objectif de ce travail est de comparer les profils protéiques de dindes et de poulets adultes, et de proposer des valeurs de référence pour toutes les fractions protéiques. L'étude a porté sur 29 dindes adultes de la souche BIG 6 en fin de cycle d'élevage, et sur 10 poulets de chair de la souche Isa 15 avant abattage. Les protéines plasmatiques ont été séparées en utilisant une électrophorèse sur gel d'agarose (Sebia, France). La lecture a été faite par densitométrie qui donne une analyse quantitative individuelle de chaque fraction. Afin de proposer des valeurs de référence, nous avons utilisé le logiciel Reference Value Advisor qui permet de calculer des limites de référence en utilisant différentes méthodes : non paramétrique, paramétrique et Robuste, avec ou sans transformation Box-Cox des valeurs. L'électrophorèse du plasma de dindes a révélé l'existence des bandes protéiques suivantes: albumine, α 1-globulines, α 2-globulines, β -globulines, et γ - globulines dans tous les échantillons. Une fraction pré-béta et deux fractions de β -globulines ont été remarquées en plus sur le plasma des poulets adultes. La méthode paramétrique pour les intervalles de référence a été utilisée quand la normalité a pu être établie utilisant le test Shapiro-Wilk. Dans tous les autres cas, c'est la méthode Robuste qui a été employée. L'électrophorèse des protéines est un test simple mais qui peut grandement aider le praticien aviaire dans le diagnostic et la prise en charge thérapeutique.

ABSTRACT

Reference intervals for total protein concentrations, plasma protein fractions, and albumin/globulins ratios in adult chickens and turkeys.

Protein electrophoresis has been used in avian medicine as a diagnostic tool for the last fifteen years, mainly in the diagnosis of inflammatory phenomena. The objective of this study was to compare protein profiles of adult turkeys and chickens and to propose reference values for all protein fractions. The study involved 29 adult turkeys BIG 6 strain at the end of the breeding cycle and 10 broilers from Isa 15 strain prior to slaughter. Plasma proteins were separated using agarose gel electrophoresis (Sebia, France). The reading was done by densitometry that gives individual quantitative analysis of each fraction. In order to propose reference values, we used Reference Value Advisor software that allows to calculating reference limits using different methods: nonparametric, parametric and Robust, with or without Box-Cox transformation of values. Turkey's plasma electrophoresis revealed the following protein bands: albumin, α 1-globulins, α 2-globulins, β -globulins, and γ -globulins in all samples. A pre-beta fraction and two fractions of β -globulins were also observed on adult chicken plasma. The parametric method for reference intervals was used when normality has been established using the Shapiro-Wilk test. In all other cases, the Robust method was used. Protein electrophoresis is a simple test that can greatly assist the avian practitioner in diagnosis and therapeutic management.

INTRODUCTION

Comme chez les mammifères, la mesure des protéines totales est souvent évaluée en plus d'autres paramètres biochimiques pour juger de l'état de santé des espèces aviaires. Cependant, une variation significative des fractions protéiques peut se produire en l'absence d'altérations dans les niveaux des protéines totales, ce qui nécessite une méthode fiable d'évaluation des fractions protéiques individuelles (Haydon 2007). L'électrophorèse des protéines plasmatiques est une procédure de diagnostic actuellement appliquée systématiquement aux espèces aviaires. Lorsqu'elle est combinée à une mesure de la teneur totale en protéines, elle permet de quantifier ces fractions (Facon et al., 2014). L'électrophorèse en gel d'agarose est actuellement la technique la plus utilisée en pathologie animale, mais elle a tendance à être supplantée chez l'homme par l'électrophorèse capillaire. Cependant, certains auteurs attirent l'attention sur les variations des résultats entre laboratoires, en particulier pour les fractions de faible amplitude (Rosenthal et al., 2005). La difficulté réside dans l'identification des différentes fractions protéiques qui ne migrent pas au même endroit chez les différentes espèces animales (Alberghina et al., 2011). En effet, il apparaît que de nombreuses publications soient contradictoires en ce qui concerne le nombre de fractions séparées, la concentration de ces fractions ou l'aspect général de la courbe d'électrophorèse. L'objectif du présent document est d'établir des intervalles de référence pour les fractions de protéines plasmatiques de dindes commerciales et de poulets de chair adultes. La Fédération internationale de chimie clinique (IFCC) a défini des directives claires pour établir ces valeurs de référence. Elle a recommandé dans un premier temps d'utiliser au moins 120 individus. Cependant, étant donné les difficultés rencontrées pour l'établissement de ces références, il est maintenant permis d'utiliser des approches statistiques alternatives telles que la méthode Robuste qui permet d'utiliser des échantillons de référence de plus petite taille (Friedrichs et al., 2012).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Matériel

Isa 15 pour le poulet de chair, et BUT Big 6 pour la dinde de chair sont les deux souches étudiées. Les échantillons ont été recueillis à l'abattoir avicole KHALED situé à EL MERIDJ (Constantine-Algérie).

1.2. Méthodes

A 8 et 22 semaines d'âge, respectivement 10 poulets et 29 dindes de chair ont été sacrifiés par décapitation. Le sang pour analyse a été recueilli à partir de la veine jugulaire et récolté dans des tubes héparinés. Le

plasma sanguin a été séparé dans les 2 heures par centrifugation à 3000 tours/min pendant 10 minutes à +4°C, puis stocké à -20°C pour les analyses ultérieures.

Analyse biochimique

La concentration totale en protéines a été déterminée pour chaque échantillon en utilisant un analyseur de chimie Randox RX Daytona (Randox Laboratories-US, Ltd. Kearneysville, Virginie-Occidentale) par la méthode du biuret (Kaplan et Pesce, 1989)

Electrophorèse des protéines

L'électrophorèse sur gel d'agarose d'échantillons de plasma non dilué congelé a été effectuée dans un tampon alcalin; Tris-barbital (pH 9,2), à l'aide de Hydragel 7 Protéine (Sebia, France), sur un système automatisé Hydrasys 2 Scan (Sebia, France).

Analyse statistique

L'analyse des données a été réalisée selon les recommandations de l'American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) sur la théorie des valeurs de référence (Friedrichs et al., 2012). L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel Reference Value Advisor version 2.1 (Geffre et al., 2011). Afin d'établir des intervalles de référence, nous avons d'abord utilisé le test de Shapiro-wilk pour évaluer la distribution des données. L'hypothèse nulle de ce test est que la population est normalement distribuée. Lorsque le nombre d'échantillons de référence est ≥ 20 et < 40 , les intervalles de référence doivent être calculés selon des méthodes robustes (indépendantes de la distribution) ou paramétriques (si la normalité a pu être établie). Pour mettre en évidence l'incertitude inhérente à la petite taille des échantillons, des intervalles de confiance de 90% ont été calculées (Friedrichs et al., 2012).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats

L'électrophorèse a révélé les fractions protéiques suivantes chez les dindes domestiques : albumine, α_1 , α_2 , β et γ globulines dans tous les échantillons de plasma. Le résultat est exprimé par une courbe à 5 pics (Figure 1). La normalité à l'aide du test de Shapiro-Wilk a été établie pour les protéines totales (g/L), l'albumine (%), α_1 globulines (g/L et %), α_2 globulines (g/L et %), β globulines (g/L et %) et le rapport A/G. La méthode robuste a été utilisée pour l'albumine (g/L) et les γ globulines (g/L et %), et la méthode paramétrique a été utilisée pour toutes les autres variables (Tableau 1). Sur plasma de poulet de chair, nous avons pu mettre en évidence en plus un pic en pré β et deux pics de β globulines. Le résultat est donc exprimé par une courbe à 7 pics (Figure 2). En raison du faible nombre d'échantillons analysés, nous n'avons pas pu établir de valeurs de référence pour les fractions protéiques sur plasma de

poulets de chair. La moyenne \pm écart-type, la médiane, la limite inférieure et la limite supérieure sont proposées (Tableau 2).

Discussion

Les **protéines totales** aviaires sont constituées d'albumine et de globulines. Elles sont un paramètre commun utilisé pour juger de l'état de santé des animaux et ont un rôle exceptionnel dans le maintien de l'homéostasie (Filipovic et al., 2007).

La détermination des protéines plasmatiques totales est réalisée par la méthodologie du biuret. Cette méthode continue d'être la technique colorimétrique la plus utilisée en médecine aviaire. Thrall et al. (2012) ont indiqué que la concentration normale des protéines plasmatiques chez les oiseaux est inférieure à celle des mammifères, généralement comprise entre 25 et 45 g/L. Les valeurs retrouvées sur les plasmas de dindes ont nettement dépassé cet intervalle allant jusqu'à 63g/L.

L'**albumine** constitue la fraction anodique la plus intense. La finesse de ce pic est un bon indicateur de la qualité de l'électrophorèse. La fraction albumine est la seule fraction composée d'une seule protéine. Elle constitue chez la plupart des animaux domestiques de 35 à 50 % des protéines totales, contrairement à l'homme chez qui elle représente entre 60 et 67 % (Kaneko, 1997). Le pourcentage d'albumine dans les plasmas de poulets a été supérieur à celui des dindes allant jusqu'à 42.9% des protéines totales. Chez les oiseaux, comme chez l'homme, l'albumine est considérée comme une protéine négative de la phase aiguë de l'inflammation (Kaneko, 1997).

Différentes méthodes ont été utilisées pour déterminer les concentrations plasmatiques en albumine. Les techniques utilisant les colorants non spécifiques sont couramment utilisées, mais elles souffrent de variabilité lorsqu'elles sont utilisées chez les espèces aviaires (Harr, 2002). La méthode de liaison au vert de Bromocrésol (BCG) ou au pourpre de Bromocrésol (BCP) n'est pas fiable sur des prélèvements aviaires. Des divergences entre les valeurs obtenues par les techniques de liaison aux colorants et celles obtenues par électrophorèse ont été démontrées pour le poulet, le canard, la dinde et les poissons (Lumeij et al., 1990). L'albumine aviaire présente une structure nettement différente de celle des mammifères et se lie de ce fait aux colorants avec une affinité réduite (Harrison et Lightfoot, 2006). Ces méthodes n'ont donc pas été validées chez les oiseaux (Lumeij et al., 1990).

Chez certaines espèces aviaires, un autre pic correspondant à la fraction pré albumine est visualisé en amont de celui de l'albumine. La bande préalbumine est composée de transthyréline, une protéine qui lie les hormones thyroïdiennes (Haydon, 2007). Chez le poulet de chair, cette fraction pré albumine a pu être mise en évidence par électrophorèse capillaire de zone, elle se situe en

position anodique par rapport au pic d'albumine (Arzour-Lakehal, 2014).

Les **alpha-globulines** constituent la fraction la plus rapide des globulines. Elles sont pour la plupart synthétisées par le foie (Kaneko, 1997). La fraction alpha est une fraction de protéines très hétérogènes présentant des rôles biologiques variables. La plupart des ces protéines sont des protéines positives de la phase aiguë de l'inflammation (Chamanza et al., 1999).

Les **beta globulines** sont elles aussi principalement synthétisées par le foie. L'importance des protéines de la fraction beta réside dans leur rôle essentiel dans le métabolisme du fer, particulièrement la transferrine et la ferritine comme formes de transport et de stockage du fer, ainsi que l'hémopexine qui maintient l'hème sous forme soluble (Kaneko, 1997). Ces protéines sont pour la plupart des protéines positives de la phase aiguë de l'inflammation. La transferrine, protéine négative de l'inflammation chez les mammifères est une protéine positive de l'inflammation chez les oiseaux (Chamanza et al., 1999).

Le fibrinogène est un très bon indicateur de l'inflammation. C'est pourquoi la plupart des auteurs choisissent d'utiliser du plasma plutôt que du sérum pour réaliser les électrophorèses des protéines sanguines chez les oiseaux (Lumeij, 2008).

La fraction **gamma** est constituée d'immunoglobulines mais elle peut, chez certaines espèces, contenir des protéines migrant normalement dans la fraction beta. Il s'agit principalement chez les oiseaux des IgM, des IgA et des IgY (correspondant aux IgG des mammifères) synthétisées par les plasmocytes. Leur élévation est la preuve d'une stimulation antigénique (Kaneko, 1997).

Par convention, chez les oiseaux, le rapport albumine/globulines est calculé en divisant la fraction albumine (A) par la somme des globulines (G). Un tel rapport est en général supérieur à 1 (Lumeij, 2008). Dans notre travail, ce rapport a atteint 1.2 sur plasma de dindes, et seulement 0.7 sur plasma de poulets de chair. L'augmentation du niveau des α , β , et γ -globulines avec l'âge, avec en même temps une diminution du niveau d'albumine ont été observées par plusieurs auteurs chez plusieurs espèces de volailles et peuvent expliquer la diminution de ce rapport en fin de cycle d'élevage chez le poulet comme rapporté dans notre étude (Filipovic et al., 2007). Ce ratio reste cependant le paramètre le plus fiable à interpréter d'un point de vue clinique, puisque tout processus inflammatoire entraîne très rapidement une inversion caractéristique de ce rapport (Lumeij, 2008). Par conséquent, l'établissement d'intervalles de référence du rapport A/G chez les oiseaux est très important.

Conclusion

L'électrophorèse des protéines est une méthode de choix permettant chez la volaille de quantifier les niveaux plasmatiques d'albumine et de globulines.

Cependant, l'interprétation d'un électrophorégramme chez les espèces aviaires reste aujourd'hui difficile en raison principalement de la rareté des valeurs de référence proposées, mais aussi de la disparité des techniques d'électrophorèse. Cette technique reste

néanmoins le meilleur moyen de mettre en évidence la fin d'un processus inflammatoire. L'utilisation de techniques normalisées et d'un plus grand nombre d'animaux aidera le praticien à établir des modèles d'électrophorégrammes pour chaque espèce aviaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alberghina, D., Giannetto, C., Vazzana, I., Ferrantelli, V. and Piccione, G., 2011. Reference intervals for total protein concentrations, serum protein fractions, and albumin/globulin ratio in clinically healthy dairy cows. *J Vet Diag Invest*, 23: 111-114.

Arzour- Lakehal, N., 2014. Normes et interprétations des dosages des paramètres biochimiques sanguins chez le poulet de chair. Thèse de Doctorat en Sciences. Université des frères Mentouri 1. Chapitre 6, p105-113.

Chamanza, R., Van Veen, L., Tivapazi, M.T. and Toussaint M.J.M., 1999. Acute phase proteins in the domestic fowl. *World Poult Sci*, 55: 61-71.

Facon, A., Roman, Y. and Guérin J.L. 2014. Assessment of inflammatory status in poultry using plasma protein electrophoresis as a diagnostic tool. *Rev Med. Vet*, 165, 11-12, 305-312.

Filipovic, N., Stojevic, S., Milinkovic-Tur, S., Ljubic, B. and Zdelar-Tuk, M., 2007. Changes in concentration and fractions of blood serum proteins of chickens during fattening. *Veterinarski arhiv*, 77(4):319-326.

Friedrichs, K.R., Harr, K.E., Freeman, K.P., Szladovits, B., Walton, R.M., Barnhart, K.F. and Blanco-Chavez, J., 2012. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet Clin Pathol* 41/4 : 441-453.

Geffré, A., Concordet, D., Braun, J.P. and Trumel, C., 2011. Reference Value Advisor : a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with microsoft excel. *Vet Clin Pathol*. 2011 Mar; 40(1):107-12.

Harr, K.E., 2002. Clinical chemistry of companion avian species: a review. *Vet Clin Path*, 3:140-151.

Harrison, G.J. and Lightfoot, T.L., 2006. Diagnostic value of biochemistry. In *Clinical avian medicine*, volume 1, Zoological education network prod, p611-629.

Haydon, S., 2007. Comparison of albumin measurements by electrophoresis and the bromocresol green method in chicken plasma. *BVZS Zoo Med Bulletin*.

Kaneko, J.J., 1997. Serum proteins and the dysproteinemias. In Kaneko JJ, ed. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th ed. San Diego, CA: Academic Press: 117-137.

Kaplan, L.A. and Pesce, A.J., 1989. *Clinical chemistry theory, analysis, and correlation*. 2nd edition. The CV Mosby Company. Saint Louis. Baltimore. Philadelphia. Toronto 1312p.

Lumeij, J.T., 2008. Avian clinical biochemistry. In Kaneko, Harvey, Bruss, editots. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6th ed. San Diego Academic press, 839- 872.

Lumeij, J.T., De Bruijne, J.J. and Kwant, M.M., 1990. Comparison of different methods of measuring protein and albumin in pigeon sera. *Avian Path*, 19:255-261.

Rosenthal, K.L., Johnston, M.S. and Shofer, F.S., 2005. Assessment of the reliability of plasma electrophoresis in birds. *Am J Vet Res*, 66: 375- 378.

Thrall, M.A., Weiser, G., Allison, R. and Campbell, T., 2012. Clinical chemistry of common non domestic mammals, birds, reptiles, fish and amphibians. In *Veterinary Haematology and Clinical Chemistry*. Second edition: 569-614.

Tableau 1. Valeurs de référence proposées pour les protéines totales, fractions protéiques, et ratio A/G sur plasma de dindes de chair.

Variable	n	Méthode paramétrique	Méthode robuste	90% IC pour limite inférieure	90% IC pour limite supérieure
Protéines totales (g/L)	29	28-59		25-32	55-63
Albumine (g/L)	29		13-29	11-15	26-32
Albumine (%)	29	43-53		41-44	52-55
α 1 globulines (g/L)	29	4-10		4-5	9-11
α 1 globulines (%)	29	14-19		13-15	19-20
α 2 globulines (g/L)	29	1-3		0.3-1	2-3
α 2 globulines (%)	29	2-6		1-2	6-7
β globulines (g/L)	29	5-14		4-6	13-15
β globulines (%)	29	16-28		15-17	26-29
γ globulines (g/L)	29		2-6	2-3	5-6
γ globulines (%)	29		6-12	5-7	11-13
Ratio A/G	29	0.7-1		0.7-0.8	1.1-1.2

Tableau 2. Moyenne \pm écart-type, médiane, limite inférieure et supérieure proposées pour les protéines totales, fractions protéiques, et ratio A/G sur plasma de poulets de chair.

Variable	n	Moyenne \pm écart-type	Médiane	Limite inférieure	Limite supérieure
Protéines totales (g/L)	10	32.9 \pm 5.8	33.6	23.8	38.8
Albumine (g/L)	10	11.8 \pm 1.9	12.5	8.3	13.8
Albumine (%)	10	36.2 \pm 3.8	35.5	31.7	42.9
α 1 globulines (g/L)	10	1.9 \pm 0.6	2.0	1.0	2.6
α 1 globulines (%)	10	5.6 \pm 1.1	5.8	4.0	6.9
α 2 globulines (g/L)	10	5.4 \pm 0.9	5.6	3.8	6.8
α 2 globulines (%)	10	16.4 \pm 1.1	16.4	15.0	17.8
Pré béta (g/L)	10	2.1 \pm 0.9	1.9	1.0	3.9
Pré béta (%)	10	6.6 \pm 2.7	5.5	2.7	10.2
β 1 globulines (g/L)	10	3.7 \pm 1.5	3.6	1.8	5.2
β 1 globulines (%)	10	11.0 \pm 3.0	11.1	7.1	16.3
β 2 globulines (g/L)	10	3.2 \pm 0.9	3.3	2.0	4.4
β 2 globulines (%)	10	9.6 \pm 1.3	9.7	7.2	11.4
γ globulines (g/L)	10	4.7 \pm 1.1	4.6	3.3	5.9
γ globulines (%)	10	14.5 \pm 2.9	14.1	10.8	19.3
Ratio A/G	10	0.6 \pm 0.1	0.5	0.5	0.7

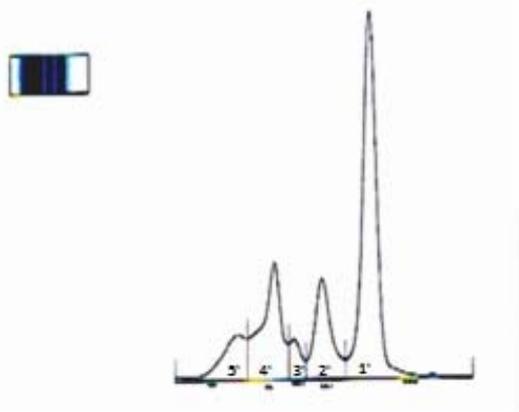


Figure 1. Profil d'électrophorèse sur plasma de dinde
1: albumine- 2: α 1 globulines- 3: α 2 globulines- 4: β globulines- 5: γ globulines.

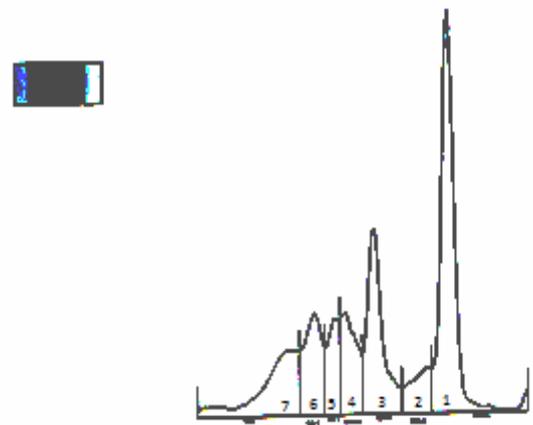


Figure 2. Profil d'électrophorèse sur plasma de poulet
1: albumine- 2: α 1 globulines- 3: α 2 globulines- 4: Pré beta globulines- 5: β 1 globulines- 6: β 2 globulines- 7: γ globulines.