

Électrophorèse des lipoprotéines sériques (lipoprotéinogramme) par le kit Hydragel Lipo + Lp(a)[®] (Sebia) : évaluation de la coloration au Fat Red 7B

Electrophoresis of serum lipoproteins (lipoproteinogram) with the Hydragel Lipo + Lp(a)[®] (Sebia) kit: evaluation of Fat Red 7B staining

Randa Bittar^{1,4}
Gautier Pierrat¹
Nabil Koujah¹
Corentin Poignon¹
Corinne Cherfils¹
Valérie Fesel-Fouquier¹
Laurence Barbot-Trystram²
Dominique Bonnefont-Rousselot^{1,3}

¹ Service de biochimie métabolique, AP-HP Sorbonne Université, Pitié-Salpêtrière-Charles Foix, Paris, France

² Service de coprologie fonctionnelle, AP-HP Sorbonne Université, Pitié-Salpêtrière-Charles Foix, Paris, France

³ Université de Paris, UTCBS, Inserm U1267, CNRS UMR 8258, Paris, France

⁴ Inserm UMR_S 1166 – ICAN, Paris, France

Résumé. Le lipoprotéinogramme (ou lipidogramme) consiste en une séparation électrophorétique des principales classes de lipoprotéines sériques. La séparation a été faite en gel d'agarose en utilisant le kit Sebia Hydragel Lipo + Lp(a)[®]. Une étude de répétabilité (n = 6) a été menée sur 3 sérums (1 normolipidémique, 1 hypertriglycéridémique et 1 présentant une Lp(a) élevée), la reproductibilité a été étudiée sur ces 3 sérums et sur un liquide d'ascite présentant des chylomicrons, pendant 6 jours (n = 6). Une approche quantitative a été faite par l'étude des aires sous la courbe et des pourcentages de fractions. Dans les deux cas (répétabilité et reproductibilité), la révélation des lipoprotéines dans le gel après migration électrophorétique a été faite soit par le colorant Noir Soudan (procédure recommandée par Sebia), soit par le Fat Red 7B. Quelle que soit la coloration, les études de répétabilité comme de reproductibilité montrent que toutes les fractions lipoprotéiniques étaient correctement détectées à leurs positions respectives, permettant de conduire à des interprétations satisfaisantes des lipoprotéinogrammes. Notre étude de reproductibilité a également permis de confirmer une bonne stabilité des fractions après 6 jours de conservation à +5 ± 3 °C. La coloration au Fat Red 7B conduit à un gain de temps technique (environ 40 min) pour les phases de séchage du gel et de coloration/décoloration, ce qui permet de répondre plus rapidement à certaines demandes urgentes telles que les diagnostics de chylothorax.

Mots clés : dyslipidémies, électrophorèse, lipoprotéines, lipoprotéinogramme

Abstract. The lipoproteinogram (or lipidogram) consists in an electrophoretic separation of the main classes of serum lipoproteins. Separation was done in agarose gel using the Sebia Hydragel Lipo + Lp(a)[®] kit. A repeatability study (n=6) was conducted on 3 sera (1 normolipidemic, 1 hypertriglyceridemic and 1 with a high Lp(a) concentration). The reproducibility was studied on these 3 sera and on an ascites liquid containing chylomicrons, upon 6 days (n=6). A quantitative approach was made by studying areas under the curve and percentages of fractions. In both cases (repeatability and reproducibility), the revelation of the lipoproteins in the gel after electrophoretic migration was made either by staining with Sudan Black (procedure recommended by Sebia), or with Fat Red 7B. Regardless of staining, both repeatability and reproducibility studies show that all lipoprotein fractions were correctly detected at their respective positions, leading to satisfactory interpretations of lipoproteinograms. Our reproducibility study also confirmed a good stability of the fractions over 6 days

Article reçu le 27 septembre 2019,
accepté le 06 novembre 2019

Correspondance : D. Bonnefont-Rousselot
<dominique.rousselot@aphp.fr>

(storage at $+5 \pm 3^\circ\text{C}$). In addition, the Fat Red 7B staining leads to a shorter technical time (about 40 min) for the gel drying and staining/destaining phases, which allows us to respond more quickly to certain urgent requests such as chylothorax diagnosis.

Key words: dyslipidemia, electrophoresis, lipoproteins, lipoproteinogram

Le lipoprotéinogramme (ou lipidogramme) consiste en une séparation électrophorétique des principales classes de lipoprotéines sériques [1]. Il permet d'apprécier, de manière beaucoup plus aisée que la méthode de référence (ultracentrifugation), les proportions relatives des fractions lipoprotéiniques. Les lipoprotéines sont séparées selon leur charge, cette dernière étant dépendante de la proportion de protéines, par migration sur un gel d'agarose. Les lipoprotéines sont ensuite révélées par un colorant spécifique des lipides, qui peut être le Noir Soudan ou le Fat Red 7B (Rouge gras). Il s'agit d'une analyse non quantitative, mais seulement qualitative ou semi-quantitative des lipoprotéines ; en effet, l'intensité de la coloration, par mesure densitométrique du colorant fixé par les lipides des lipoprotéines, reflète la richesse des lipoprotéines en lipides et non la quantité des lipoprotéines. Les lipoprotéines de très basse densité (*very low density lipoproteins*, VLDL) migrent en

position pré- β , les lipoprotéines de basse densité (*low density lipoproteins*, LDL) en position β et les lipoprotéines de haute densité (*high density lipoproteins*, HDL) en position α . Si des chylomicrons sont présents, ils restent dans le puits de dépôt en raison de leur très faible charge électrique et de leur taille très volumineuse (*figure 1*).

Le principal intérêt du lipoprotéinogramme, qui n'est plus inscrit à la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM), est d'aider les cliniciens dans des interprétations délicates de l'exploration du métabolisme des lipoprotéines, pour "typer" certaines hyperlipoprotéinémies correspondant à la classification de Fredrickson (*tableau 1*) [2]. Ainsi, en cas d'hypertriglycéridémie, le lipoprotéinogramme permet d'établir si l'élévation des triglycérides circulants est liée à une augmentation de la proportion de pré- β -lipoprotéines (voie endogène) et/ou à la persistance anormale de chylomicrons (voie exogène)

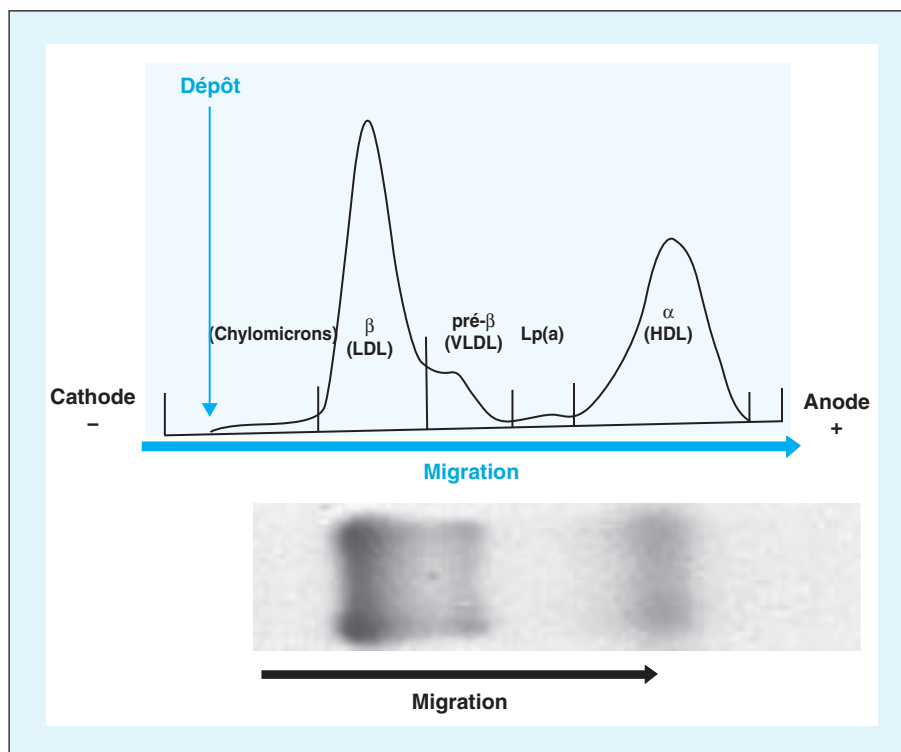


Figure 1. Lipoprotéinogramme d'un sujet normolipidémique obtenu après électrophorèse du sérum en gel d'agarose et coloration par le Noir Soudan. HDL : lipoprotéines de haute densité ; LDL : lipoprotéines de basse densité ; VLDL : lipoprotéines de très basse densité ; Lp(a) : lipoprotéine (a).

Tableau 1. Classification des dyslipoprotéinémies familiales selon Fredrickson et Lees [2].

Type de la dyslipidémie	Caractéristiques biochimiques et électrophorétiques	Fraction lipoprotéinique augmentée ou anormalement présente
I (hypertriglycémie exogène)	Sérum lactescent à jeun (crémage) ; cholestérol normal ou légèrement ↑, et triglycérides très ↑ Pas de migration électrophorétique (présence dans le puits de dépôt)	Présence de chylomicrons
IIa (hypercholestérolémie essentielle)	Sérum clair à jeun ; cholestérol très ↑, triglycérides normaux Lipoprotéinogramme : ↑β-lipoprotéines	↑LDL
IIb (hyperlipidémie mixte ou combinée)	Sérum opalescent à jeun ; cholestérol et triglycérides ↑ Lipoprotéinogramme : ↑β- et ↑pré-β-lipoprotéines	↑LDL et ↑VLDL
III (dysbétalipoprotéinémie)	Sérum opalescent à jeun ; cholestérol et triglycérides ↑ Lipoprotéinogramme : "broad-β"-lipoprotéines (β-large)	↑IDL
IV (hypertriglycémie endogène)	Sérum opalescent à jeun ; cholestérol normal ou modérément ↑ et triglycérides nettement ↑ Lipoprotéinogramme : ↑β- et ↑pré-β-lipoprotéines	↑VLDL
V (hypertriglycémie mixte)	Sérum opalescent à jeun ; cholestérol normal ou modérément ↑ et triglycérides nettement ↑ Lipoprotéinogramme : ↑β- et ↑pré-β-lipoprotéines	Présence de chylomicrons et ↑VLDL

↑ : augmentation

après 12 h de jeûne (présence de chylomicrons dans les types I et V de la classification de Fredrickson et Lees) [2]. Le lipoprotéinogramme contribue également, devant une augmentation concomitante du cholestérol total et des triglycérides, à la différenciation des dyslipidémies mixtes de type IIb (fréquent) et des dysbétalipoprotéinémies de type III (rare), ce dernier type étant caractérisé par la présence d'une bande dite *broad β* (β large), correspondant aux lipoprotéines de densité intermédiaire (*intermediate density lipoproteins*, IDL). Les IDL ont en effet une densité, une composition et un positionnement électrophorétique intermédiaires entre ceux des VLDL et ceux des LDL. La migration sur des gels d'agarose spécifiques commercialisés (Hydragel Lipo + Lp(a)®, Sebia) permet de mettre en évidence la lipoprotéine Lp(a) si sa concentration est suffisamment élevée [3]. Enfin, le lipoprotéinogramme permet la mise en évidence de lipoprotéines particulières telles que la LPX dans les syndromes de cholestase, bien que cette dernière indication ne soit pas nécessaire au diagnostic [4, 5].

Dans une première partie du travail, le protocole préconisé par Sebia a été strictement respecté et les résultats de répétabilité et reproductibilité sont présentés avec révélation des lipoprotéines par le Noir Soudan. Une deuxième partie présente ces résultats avec coloration au Fat Red 7B, colorant utilisé dans le service depuis plusieurs années de manière satisfaisante.

Matériel et méthodes

Prélèvements

L'étude de répétabilité et de reproductibilité a été réalisée sur 3 sérums de patients (cas 1, 2 et 3), et la reproductibilité a également été étudiée sur un liquide d'ascite (cas 4).

Les prélèvements de sang veineux ont été effectués dans le cadre d'une prescription d'EAL (exploration d'une anomalie lipidique) complétée par une demande de lipoprotéinogramme, sur tube sec avec séparateur (Vacutainer® SST™ II Advance, Becton Dickinson, référence 367955), les patients étant à jeun depuis 12 h. Les prélèvements de sang, après acheminement au laboratoire à température ambiante, ont été centrifugés à 4 437 g pendant 10 min à $+20 \pm 3$ °C, afin de recueillir le sérum. L'électrophorèse a été réalisée dans un délai maximal de 48 h, sur sérum conservé à $+5 \pm 3$ °C. Les 3 échantillons de sérums étudiés ont été sélectionnés parmi les prélèvements reçus au laboratoire, ils présentaient les caractéristiques suivantes :

- cas 1 : sérum normolipidémique (aspect limpide ; cholestérol total : 5,38 mmol/L ; triglycérides : 0,96 mmol/L ; cholestérol-HDL : 1,47 mmol/L ; cholestérol-LDL : 3,47 mmol/L) ;
- cas 2 : sérum hypertriglycémique, avec présence de chylomicrons et augmentation de la fraction des pré-béta-lipoprotéines (VLDL) (aspect opalescent ; cholestérol total :

4,63 mmol/L ; triglycérides : 3,43 mmol/L ; cholestérol-HDL : 0,99 mmol/L ; cholestérol-LDL : 2,08 mmol/L) ;
– cas 3 : sérum avec augmentation de la Lp(a) (aspect limpide ; cholestérol total : 3,14 mmol/L ; triglycérides : 0,87 mmol/L ; cholestérol-HDL : 0,84 mmol/L ; cholestérol-LDL : 1,90 mmol/L ; Lp(a) : 1,80 g/L).

Un liquide d'ascite reçu pour recherche de chylomicrons correspondait au cas 4 (aspect lactescent ; cholestérol total : 2,91 mmol/L ; triglycérides : 4,02 mmol/L) et a été utilisé pour tester la reproductibilité, ce qui a conduit à étudier en parallèle la stabilité des chylomicrons sur 1 semaine (conservation à $+5 \pm 3$ °C).

En pratique quotidienne, les demandes de lipoprotéinogrammes reçues au laboratoire sont toujours réalisées sur échantillons frais. Les lipoprotéines sont séparées selon leur charge électrophorétique sur gel d'agarose, à pH 7,5, selon les modalités recommandées par le fournisseur (Kit Hydragel Lipo + Lp(a)[®] K 20 Sebia, référence 3007 ; générateur de courant GD 61 Sebia). Pour le contrôle interne de la qualité, un sérum de patient du jour avec bilan lipidique normal est déposé sur le gel comportant les sérums des patients à tester. Par ailleurs, un contrôle externe de qualité est réalisé régulièrement par la mise en place d'un contrôle inter-laboratoires.

Etude de l'influence du type de révélation (Noir Soudan ou Fat Red 7B)

La révélation des bandes de lipoprotéines après migration puis séchage du gel (incubateur sécheur Sebia) a été faite par le Noir Soudan (modalité préconisée par Sebia), et par le Fat Red 7B.

Le colorant Noir Soudan a été préparé extemporanément, par mélange de 1 mL de Noir Soudan concentré (66 g/L dans le diméthylformamide) fourni dans le kit Sebia avec 80 mL d'éthanol pur et 75 mL d'eau distillée. Après une agitation de 30 min à l'abri de toute source de chaleur, le colorant dilué est stable pendant au maximum 12 h à température ambiante, en étant conservé hermétiquement pour éviter l'évaporation. La solution de lavage est fournie concentrée (16 mL, à compléter à 1 L avec de l'eau distillée). Après dilution, son pH est $8,8 \pm 0,3$ et elle se conserve à température ambiante jusqu'à la date de péremption. La solution de décoloration doit être préparée extemporanément (15 min avant utilisation), par mélange d'éthanol pur et d'eau distillée 45/55 (v/v). Ce décolorant, conservé à température ambiante dans un récipient hermétiquement fermé pour éviter l'évaporation, est stable 1 mois.

Le colorant Fat Red 7B a été préparé à partir de la poudre commercialisée chez Helena France (référence 5322). Deux solutions distinctes ont été préparées : une solution Fat Red 7B-Méthanol (0,7 g de Fat Red 7B à dissoudre dans 1 L de méthanol, agiter 48 h et filtrer, et conserver au maxi-

mum 6 mois à température ambiante dans un flacon ambré) et une solution Fat Red 7B-Ethanol (même préparation mais en dissolvant le Fat Red 7B dans l'éthanol au lieu du méthanol). La solution de coloration se prépare extemporanément en mélangeant 5 mL de colorant Fat Red 7B-Méthanol et 5 mL de colorant Fat Red 7B-Ethanol auxquels sont ajoutés, goutte à goutte tout en agitant, 2 mL d'eau distillée. Après migration, le gel est séché et placé 2 minutes dans la solution de coloration en agitant par des mouvements rotatifs, puis le gel est égoutté et mis dans la solution de décoloration constituée d'un mélange éthanol/eau 50/50 (v/v) dont la stabilité est de 6 mois à température ambiante, en flacon hermétiquement bouché.

La lecture de l'intensité des bandes de lipoprotéines dans le gel après coloration est réalisée à 570 nm grâce à un densitomètre Hyrys 2 Sebia.

Les principales étapes techniques sont résumées dans le *tableau 2*.

Pour l'étude de la répétabilité, chaque sérum (cas 1, 2 et 3) a été déposé 6 fois sur un même gel. Pour la reproductibilité, les sérums des cas 1, 2, 3 ainsi que le liquide d'ascite (cas 4) ont été déposés sur 6 gels distincts, au cours de 6 séries différentes (1 série par jour). Les échantillons des cas 2, 3 et 4 ont été déposés en double sur le même gel, en présence du cas 1 (sérum témoin normolipidémique) également déposé en double aux jours J1, J2, J3, J5 e J6. À J4, les dépôts ont été réalisés en simple et non en double.

Résultats

Le lipoprotéinogramme est une analyse semi-quantitative : l'interprétation rendue au clinicien est qualitative ; cependant, la technique impliquant une lecture d'absorbance, la répétabilité et la reproductibilité seront évaluées sur cette mesure.

Les interprétations des lipoprotéinogrammes des 4 cas testés sont résumées dans le *tableau 3*. Afin d'avoir une estimation quantitative après intégration des gels colorés, les aires sous la courbe (AUC) relatives à chacune des bandes de lipoprotéines et fournies lors de l'intégration ont été notées, permettant de calculer le coefficient de variation (CV). Les pourcentages de chaque fraction ont été reportés sous forme de moyenne et écart-type, permettant également de calculer un CV.

Répétabilité et reproductibilité avec révélation des lipoprotéines par le Noir Soudan

Les résultats de répétabilité sont présentés dans la *figure 2A* et le *tableau 4*, et ceux de reproductibilité dans la *figure 2B* et le *tableau 5*.

L'étude de répétabilité après coloration par le Noir Soudan permet de montrer que toutes les fractions attendues

Tableau 2. Conditions techniques comparatives selon le type de colorant utilisé pour la révélation des bandes de lipoprotéines.

	Avec coloration au Noir Soudan	Avec coloration au Fat Red 7B
Conditions de migration	Sebia K20	Sebia K20
Volume de tampon par compartiment	150 mL	150 mL
Volume total de tampon	300 mL	300 mL
Temps de migration	90 min	90 min
Voltage constant	50 V	52 V
Ampérage de départ (par gel)	1 ± 2 mA	1 ± 2 mA
Séchage	45 min à 80 °C	20 min à 51 °C
Temps de coloration	15 min	2 min
Temps de décoloration	5 min	30 s à 1 min
Lavage	1 min (solution de lavage)	Rincer le gel à l'eau
Séchage	5 min à 80 °C	10 min à 51 °C
Longueur d'onde de lecture	570 nm	570 nm

Tableau 3. Interprétation des lipoprotéinogrammes pour les 4 cas testés.

	Chylomicrons	Bêta-lipoprotéines	Pré-bêta-lipoprotéines	Lp(a)	Alpha-lipoprotéines
Cas 1	Absence	Normal	Normal	Normal	Normal
Cas 2	Présence	Diminué	Augmentation importante	Normal	Diminué
Cas 3	Absence	Normal limite inférieure	Normal	Augmentation très importante	Diminué
Cas 4	Présence	Présence	Présence	Absence	Présence

étaient positionnées correctement et de manière similaire dans les puits 1 à 6 de chaque gel, conduisant à une interprétation satisfaisante des lipoprotéinogrammes. Sur le plan quantitatif, les fractions présentant les AUC ou les pourcentages de fractions les plus faibles ont donné lieu, de manière attendue, à des CV plus élevés.

Des observations similaires peuvent être tirées des résultats de reproductibilité avec toutefois, de façon logique, des CV souvent plus élevés qu'en répétabilité. Ainsi, si l'on considère uniquement les 2 fractions majoritaires dans le sérum (α - et β -lipoprotéines, cas 1 à 3), les CV de répétabilité étaient en moyenne (range) de 11,4 % (5,9-16,5 %) en AUC et de 5,1 % (1,7-8,0 %) en pourcentages de fractions, alors que les CV de reproductibilité étaient respectivement de 17,1 % (11,3-22,5 %) et 5,0 % (2,5-9,0 %).

Répétabilité et reproductibilité avec coloration au Fat Red 7B

Les résultats de répétabilité après coloration du gel au Fat Red 7B sont présentés dans la *figure 3A* et le *tableau 4*, et ceux de reproductibilité dans la *figure 3B* et le *tableau 5*. Comme après coloration par le Noir Soudan, la répétabilité a permis d'observer le maintien des bandes de lipoprotéines dans leur position respective, conduisant à une interprétation des lipoprotéinogrammes conforme aux attentes. Les CV étaient classiquement plus élevés pour les AUC et les pourcentages de fractions les plus bas. Les CV de reproduc-

tibilité étaient globalement plus élevés qu'en répétabilité. Ainsi, si l'on considère uniquement les 2 fractions majoritaires dans le sérum (α - et β -lipoprotéines, cas 1 à 3), les CV de répétabilité étaient en moyenne (range) de 7,1 % (5,1-10,1 %) en AUC et de 5,6 % (1,7-9,6 %) en pourcentages de fractions, alors que les CV de reproductibilité étaient respectivement de 21,0 % (16,6-25,2 %) et 7,9 % (3,8-16,3 %). L'étude de reproductibilité a permis d'observer un positionnement correct des bandes de lipoprotéines permettant une interprétation similaire entre les différents jours testés pour les 4 cas.

La comparaison des CV relatifs aux fractions majoritaires sériques entre les 2 types de colorations montre, pour la répétabilité avec le Fat Red 7B, des CV plus faibles pour l'expression en AUC (7,1 % vs. 11,4 %) et équivalents pour l'expression en pourcentages de fractions (5,6 % vs. 5,1 %), comparativement à la coloration au Noir Soudan. Les CV de reproductibilité apparaissent un peu plus élevés en Fat Red 7B qu'en Noir Soudan (21,0 % vs. 17,1 % en AUC et 7,9 % vs. 5,0 % en pourcentages de fractions).

Discussion et conclusion

Après coloration par le Noir Soudan ou par le Fat Red 7B, la répétabilité et la reproductibilité montrent que toutes les fractions lipoprotéiniques étaient correctement détectées

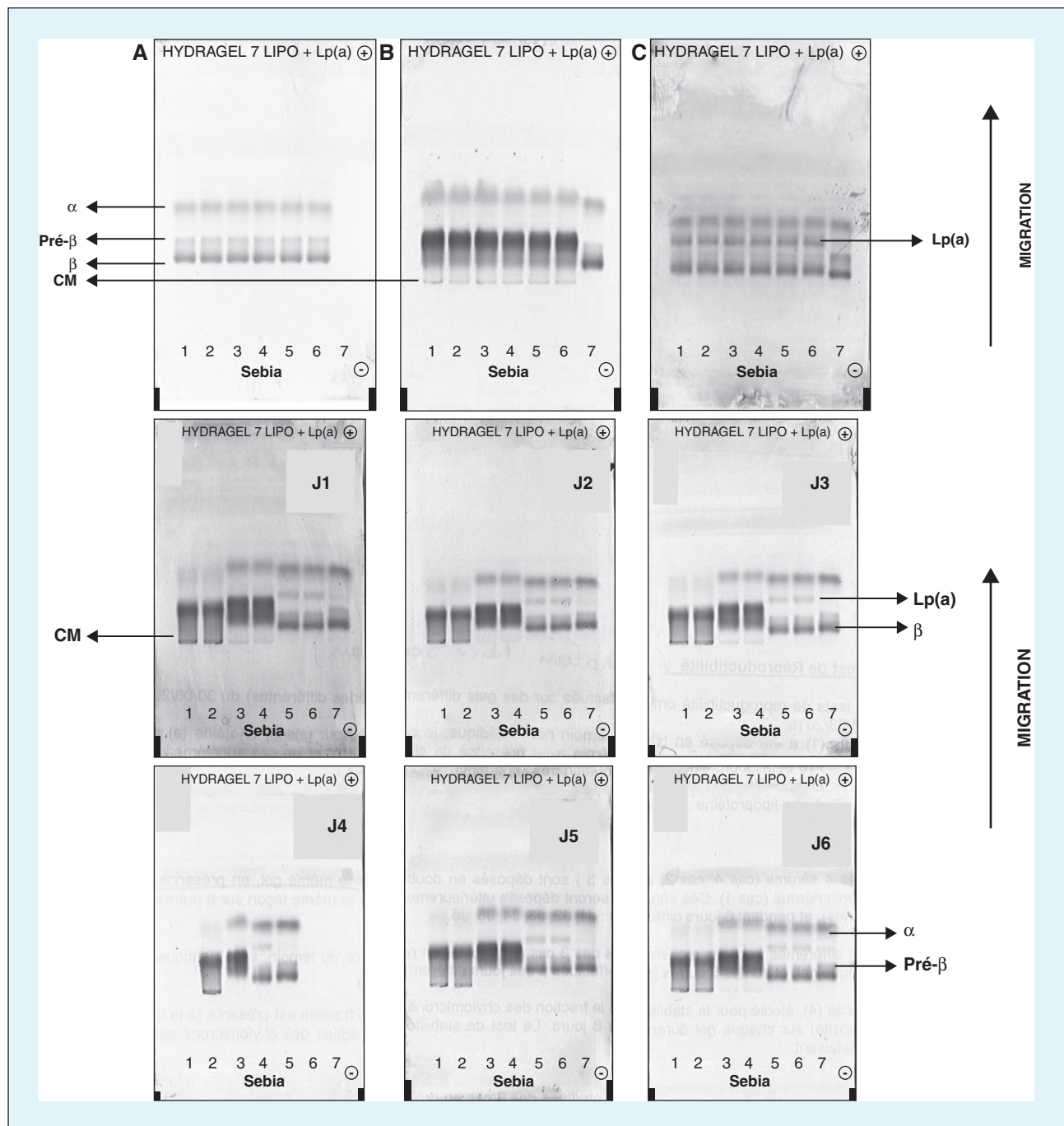


Figure 2. Étude de répétabilité et de reproductibilité après électrophorèse du sérum et coloration par le Noir Soudan. **a)** Étude de répétabilité. **A** : puits 1 à 6 : cas 1 (sérum normolipidémique) ; **B** : puits 1 à 6 : cas 2 (sérum hypertriglycéridémique) ; puits 7 : cas 1 (témoin normolipidémique) ; **C** : puits 1 à 6 : cas 3 (sérum avec augmentation de la Lp(a)) ; puits 7 : cas 1 (témoin normolipidémique). CM : chylomicrons. **b)** Étude de reproductibilité. J1, J2, J3, J5 et J6 : puits 1 et 2 : cas 4 (ascite) ; puits 3 et 4 : cas 2 (sérum hypertriglycéridémique) ; puits 5 et 6 : cas 3 (sérum avec augmentation de la Lp(a)) ; puits 7 : cas 1 (témoin normolipidémique). J4 : puits 2 : cas 4 (ascite) ; puits 3 : (sérum hypertriglycéridémique) ; puits 4 : cas 3 (sérum avec augmentation de la Lp(a)) ; puits 5 : cas 1 (témoin normolipidémique).

Tableau 4. Étude quantitative de la répétabilité sur les cas 1, 2 et 3 (n = 6).

Fraction	AUC Cas 1				AUC Cas 2				AUC Cas 3			
	Noir Soudan		Fat Red 7B		Noir Soudan		Fat Red 7B		Noir Soudan		Fat Red 7B	
	AUC (moyenne ± SD)	CV (%)	AUC (moyenne ± SD)	CV (%)	AUC (moyenne ± SD)	CV (%)	AUC (moyenne ± SD)	CV (%)	AUC (moyenne ± SD)	CV (%)	AUC (moyenne ± SD)	CV (%)
Chylomicrons	0,7 ± 0,5	71,4	1,3 ± 1,0	76,9	15,5 ± 2,4	15,5	23 ± 2,9	12,6	1,0 ± 0,0	0,0	2,8 ± 1,9	67,9
Bêta-LP	171,2 ± 10,1	5,9	435 ± 22,3	5,1	102,8 ± 16,8	16,3	154,8 ± 4,4	2,8	104 ± 15,9	15,3	226,2 ± 19,5	8,6
Pré-bêta-LP	37,7 ± 5,4	14,3	92 ± 7,4	8,0	416,3 ± 52,6	12,6	666,3 ± 52,6	7,9	32,0 ± 7,0	21,9	48,5 ± 6,6	13,6
Lp(a)	1,7 ± 1,0	58,8	8,7 ± 2,3	26,4	5,8 ± 2,5	43,1	11,7 ± 1,8	15,4	88,3 ± 7,0	7,9	150,8 ± 8,5	5,6
Alpha-LP	91,3 ± 6,0	6,6	233 ± 18,9	8,1	71,7 ± 10,2	14,2	137 ± 13,9	10,1	71,2 ± 7,1	10,0	121,7 ± 9,4	7,7
% fractions Cas 1												
% fractions Cas 2												
% fractions Cas 3												
Fraction	Noir Soudan		Fat Red 7B		Noir Soudan		Fat Red 7B		Noir Soudan		Fat Red 7B	
	% (moyenne ± SD)	CV (%)	% (moyenne ± SD)	CV (%)	% (moyenne ± SD)	CV (%)	% (moyenne ± SD)	CV (%)	% (moyenne ± SD)	CV (%)	% (moyenne ± SD)	CV (%)
Chylomicrons	0,2 ± 0,2	100,0	0,2 ± 0,1	50,0	2,5 ± 0,3	12,0	2,3 ± 0,3	13,0	0,4 ± 0,1	25,0	0,6 ± 0,2	33,3
Bêta-LP	55,8 ± 1,9	3,4	57,1 ± 5,5	9,6	16,8 ± 1,1	6,5	15,6 ± 0,8	5,1	35,1 ± 2,8	8,0	44,1 ± 1,0	2,3
Pré-bêta-LP	12,4 ± 1,0	8,1	11,9 ± 0,4	3,4	68,0 ± 1,0	1,5	67,1 ± 0,8	1,2	10,9 ± 2,8	25,7	17,8 ± 1,1	6,2
Lp (a)	0,5 ± 0,3	60	1,1 ± 0,3	27,3	1,0 ± 0,35	30,0	1,2 ± 0,2	16,7	29,8 ± 0,5	1,7	16,8 ± 0,4	2,4
Alpha-LP	30,1 ± 0,5	1,7	30,2 ± 1,4	4,6	11,7 ± 0,6	5,1	13,8 ± 0,6	4,3	24,0 ± 1,5	6,2	20,7 ± 1,6	7,7

AUC : aire sous la courbe ; CV : coefficient de variation ; LP : lipoprotéines ; SD : écart-type. % fractions : pourcentage de chaque fraction lipoprotéinique.

Tableau 5. Étude quantitative de la reproductibilité sur les cas 1, 2, 3 et 4 (n = 6).

AUC Cas 1				AUC Cas 2				AUC Cas 3				AUC Cas 4				
Fraction	Noir Soudan		Fat Red 7B		Noir Soudan		Fat Red 7B		Noir Soudan		Fat Red 7B		Noir Soudan		Fat Red 7B	
	AUC (moyenne \pm SD)	CV (%)	AUC (moyenne \pm SD)	CV (%)	AUC (moyenne \pm SD)	CV (%)	AUC (moyenne \pm SD)	CV (%)	AUC (moyenne \pm SD)	CV (%)	AUC (moyenne \pm SD)	CV (%)	AUC (moyenne \pm SD)	CV (%)	AUC (moyenne \pm SD)	CV (%)
Chylomicrons	2,70 \pm 1,63	60,4	6,2 \pm 2,3	37,1	9,2 \pm 7,6	82,6	14,4 \pm 6,8	47,2	2,0 \pm 0,6	30,0	2,6 \pm 1,7	65,4	51,5 \pm 11,6	22,5	116,3 \pm 18,4	15,8
Bêta-LP	129,2 \pm 29,1	22,5	260,6 \pm 53,0	20,3	208,0 \pm 38,6	18,6	398,0 \pm 65,9	16,6	101,0 \pm 18,3	18,1	210,3 \pm 41,7	19,8	98,8 \pm 21,7	22,0	197,1 \pm 54,0	27,4
Pré-bêta-LP	40,3 \pm 11,7	29	100,6 \pm 20,9	20,8	285,5 \pm 39,5	13,8	462,8 \pm 31,4	6,8	37,1 \pm 2,7	7,3	75,1 \pm 12,7	16,9	250,8 \pm 41,0	16,3	496,8 \pm 27,7	5,6
Lp(a)	15,2 \pm 11,7	77	27,2 \pm 13,8	50,7	5,5 \pm 2,0	36,4	4,0 \pm 2,0	50,0	23,3 \pm 3,3	14,2	74,6 \pm 20,7	27,7	6,0 \pm 3,9	65,0	6,8 \pm 1,6	23,5
Alpha-LP	106,0 \pm 12,0	11,3	261,0 \pm 65,7	25,2	68,0 \pm 12,6	18,5	147,8 \pm 31,1	21,0	88,3 \pm 12,2	13,8	200,0 \pm 47,2	23,6	24,1 \pm 8,0	33,2	60,6 \pm 25,3	41,7
% fractions Cas 1				% fractions Cas 2				% fractions Cas 3				% fractions Cas 4				
Fraction	Noir Soudan		Fat Red 7B		Noir Soudan		Fat Red 7B		Noir Soudan		Fat Red 7B		Noir Soudan		Fat Red 7B	
	% (moyenne \pm SD)	CV (%)	% (moyenne \pm SD)	CV (%)	% (moyenne \pm SD)	CV (%)	% (moyenne \pm SD)	CV (%)	% (moyenne \pm SD)	CV (%)	% (moyenne \pm SD)	CV (%)	% (moyenne \pm SD)	CV (%)	% (moyenne \pm SD)	CV (%)
Chylomicrons	0,9 \pm 0,6	66,6	1,0 \pm 0,4	40,0	1,4 \pm 0,8	57,1	1,6 \pm 0,5	31,2	0,8 \pm 0,3	37,5	0,6 \pm 0,2	33,3	11,9 \pm 2,3	19,3	13,5 \pm 2,1	15,6
Bêta-LP	43,9 \pm 1,1	2,5	40,4 \pm 3,1	7,7	36,2 \pm 1,7	4,7	37,2 \pm 3,6	9,7	40,6 \pm 2,2	5,4	37,3 \pm 1,4	3,8	23,0 \pm 2,7	11,7	22,6 \pm 4,5	19,9
Pré-bêta-LP	13,7 \pm 1,2	8,8	15,5 \pm 1,9	12,8	49,5 \pm 2,9	5,9	46,0 \pm 3,7	8,0	14,3 \pm 1,2	8,4	13,9 \pm 1,1	7,9	59,4 \pm 3,2	5,4	55,7 \pm 5,3	9,5
Lp(a)	3,9 \pm 0,7	17,9	4,1 \pm 0,5	12,2	1,0 \pm 0,2	20,0	0,6 \pm 0,2	33,3	9,6 \pm 0,6	6,2	13,1 \pm 1,1	8,4	1,1 \pm 0,5	45,4	0,9 \pm 0,3	33,3
Alpha-LP	36,7 \pm 3,3	9,0	39,3 \pm 2,1	5,3	12,0 \pm 0,6	5,0	14,7 \pm 2,4	16,3	34,7 \pm 1,1	3,2	35,1 \pm 1,6	4,6	5,0 \pm 1,0	20,0	7,6 \pm 2,0	26,3

AUC : aire sous la courbe ; CV : coefficient de variation ; LP : lipoprotéines ; SD : écart-type. % fractions : pourcentage de chaque fraction lipoprotéinique.

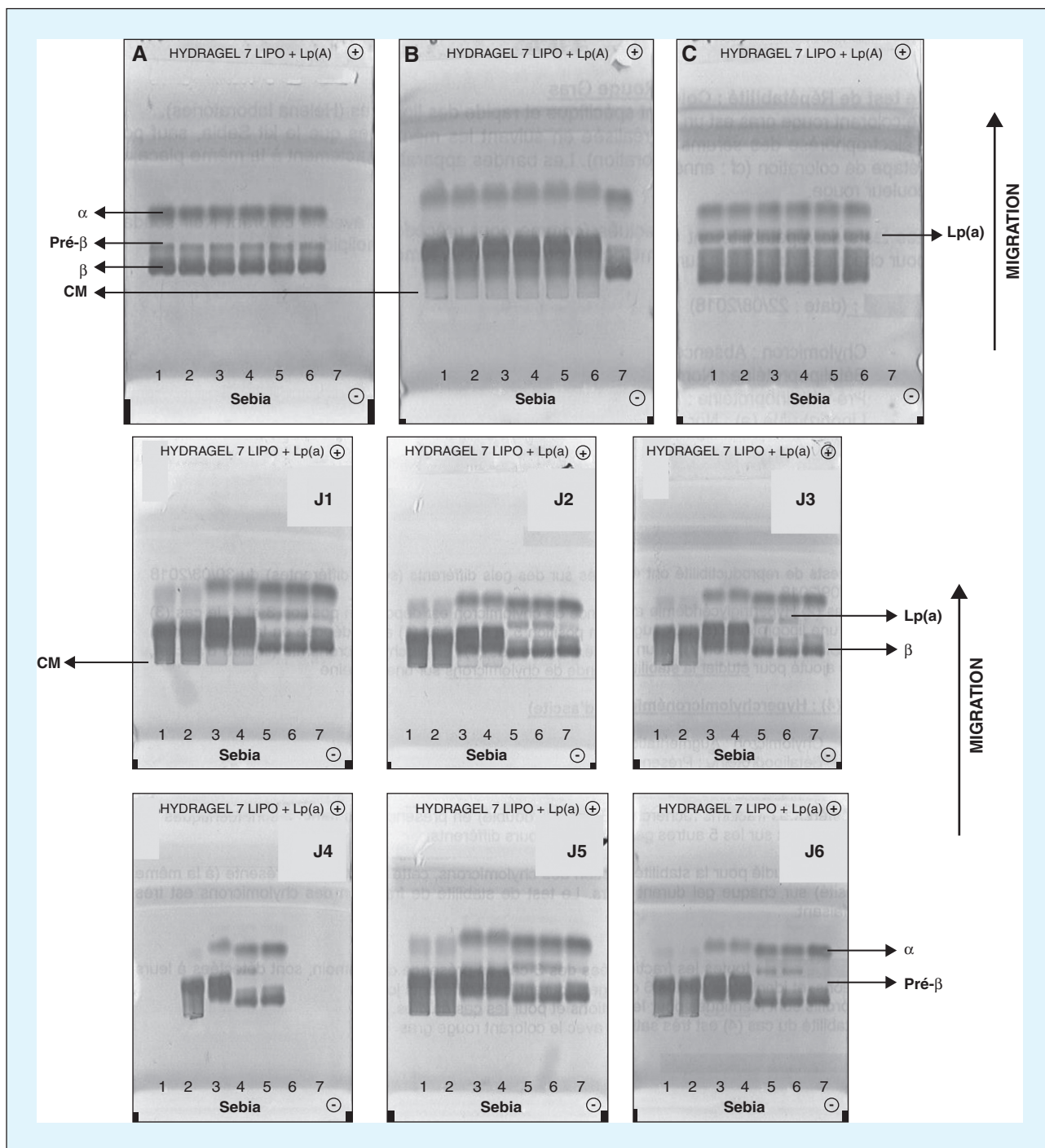


Figure 3. Étude de répétabilité et de reproductibilité après électrophorèse du sérum et coloration par le Fat Red 7B. **a)** Étude de répétabilité. **A** : puits 1 à 6 : cas 1 (sérum normolipidémique) ; **B** : puits 1 à 6 : cas 2 (sérum hypertriglycéridémique) ; puits 7 : cas 1 (témoin normolipidémique) ; **C** : puits 1 à 6 : cas 3 (sérum avec augmentation de la Lp(a)) ; puits 7 : cas 1 (témoin normolipidémique). CM : chylomicrons. **b)** Étude de reproductibilité. J1, J2, J3, J5 et J6 : puits 1 et 2 : cas 4 (ascite) ; puits 3 et 4 : cas 2 (sérum hypertriglycéridémique) ; puits 5 et 6 : cas 3 (sérum avec augmentation de la Lp(a)) ; puits 7 : cas 1 (témoin normolipidémique). J4 : puits 2 : cas 4 (ascite) ; puits 3 : (sérum hypertriglycéridémique) ; puits 4 : cas 3 (sérum avec augmentation de la Lp(a)) ; puits 5 : cas 1 (témoin normolipidémique). CM : chylomicrons.

à leurs positions respectives, permettant une interprétation satisfaisante par rapport au témoin normolipidémique déposé en parallèle, qu'il s'agisse de la présence anormale de chylomicrons, d'une élévation de la proportion de pré- β lipoprotéines ou d'une Lp(a) élevée. Pour ce type de technique manuelle et semi-quantitative, un seuil de CV à 30 % pour la reproductibilité est acceptable et ne remet pas en cause l'interprétation ; pour les fractions lipoprotéiniques ayant des valeurs d'AUC très basses (chylomicrons, Lp(a)), un CV supérieur à 30 % a été accepté. Par ailleurs, notre étude de reproductibilité permet de confirmer la bonne stabilité des fractions sur 6 jours à $+5 \pm 3$ °C, particulièrement sur le sérum ; concernant la fraction des α -lipoprotéines dans le liquide d'ascite (cas 4), elle présente une variabilité d'AUC supérieure à 30 %, mais sans que cela n'ait d'impact sur l'interprétation rendue lors d'une demande de recherche de chylomicrons (présence ou absence de chylomicrons dans le liquide d'ascite). Le calcul des CV à partir des pourcentages de fractions lipoprotéiniques fait généralement apparaître des valeurs plus basses de CV, en faveur du maintien d'une interprétation correcte même après 6 jours de conservation à $+4$ °C.

La comparaison des résultats obtenus avec les deux types de coloration permet toutefois d'observer sur le plan quantitatif des CV relatifs aux AUC souvent plus faibles en Fat Red 7B qu'en Noir Soudan, peut-être en lien avec des valeurs absolues d'AUC généralement plus élevées après coloration au Fat Red 7B, ce qui pourrait témoigner d'une meilleure sensibilité de cette coloration.

La plus grande stabilité des solutions de coloration/décoloration conduit également à privilégier la coloration au Fat Red 7B (solutions de coloration et de décoloration stables 6 mois pour le Fat Red 7B, vs. préparation extemporanée de la solution de coloration et stabilité 1 mois de la solution de décoloration pour le Noir Soudan). La coloration au Fat Red 7B permet aussi une moindre fréquence d'élimination des solvants par la filière spécifique ; ainsi, pour la coloration, utilisation rapide (2 min) d'un faible volume de mélange méthanol/éthanol/eau (10 mL), alors que la coloration par le Noir Soudan demande à chaque fois la consommation de 80 mL d'éthanol.

Comme précisé dans le *tableau 3*, la coloration au Fat Red 7B conduit à un gain de temps technique (environ 40 min) pour les phases de séchage du gel et de

coloration/décoloration, ce qui permet de répondre plus rapidement (en moins de 3 h) à certaines demandes urgentes (en particulier, recherche de chylomicrons dans un liquide pleural afin de poser un diagnostic de chylothorax au décours d'une intervention chirurgicale [6]), notamment pour des services pédiatriques. Toutefois, peu de laboratoires disposent de la technique du lipoprotéinogramme qui constitue le « gold standard » pour le diagnostic d'un chylothorax dans un liquide de plèvre ; une orientation diagnostique peut être basée sur l'aspect du liquide après 12 h à 4 °C (présence d'une couche de chylomicrons surnageante), la concentration des protéines et l'activité de la lactate deshydrogénase (80 % des chylomicrons sont des exsudats), ainsi que les concentrations du cholestérol (< 5 mmol/L) et des triglycérides ($> 1,25$ mmol/L) [7-9].

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêts en rapport avec cet article.

Références

1. Greenspan P, Mao FW, Ryu BH, Gutman RL. Advances in agarose gel electrophoresis of serum lipoproteins. *J Chromatogr A* 1995 ; 698 : 333-9.
2. Fredrickson DS, Lees RS. A system for phenotyping hyperlipoproteinemia. *Circulation* 1965 ; 31 : 321-7.
3. Campos E, Fievet P, Cacès E, Fruchart JC, Fievet C. A screening method for abnormally high lipoprotein (a) concentrations by agarose lipoprotein electrophoresis. *Clin Chim Acta* 1994 ; 230 : 43-50.
4. Bonnefont-Rousselot D. Le bilan lipidique en 2016. *Feuilles de Biologie* 2016 ; 330 : 39-52.
5. Bonnefont-Rousselot D, Dubus I, Bard JM. Anomalies du métabolisme des lipides : les dyslipoprotéinémies. In : Bonnefont-Rousselot D, Beaudeau JL, Charpiot P, eds. *Explorations en biochimie médicale : interprétations et orientations diagnostiques*. Paris : Lavoisier, 2019 : 95-109.
6. Gibbons SM, Ahmed F. Chylothorax diagnosis : can the clinical chemistry laboratory do more ? *Ann Clin Biochem* 2015 ; 52 : 173-6.
7. Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball Jr. WC. Pleural effusions : the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med* 1972 ; 77 : 507-13.
8. Staats BA, Ellefson RD, Budahn LL, Dines DE, Prakash UB, Offord K. The lipoprotein profile of chylous and nonchylous pleural effusions. *Mayo Clin Proc* 1980 ; 55 : 700-4.
9. Oudart JB, Pax C, Bennani-Smires B, Ramont L. Milky pleural fluid. *Clin Chem* 2016 ; 62 : 315-7.