

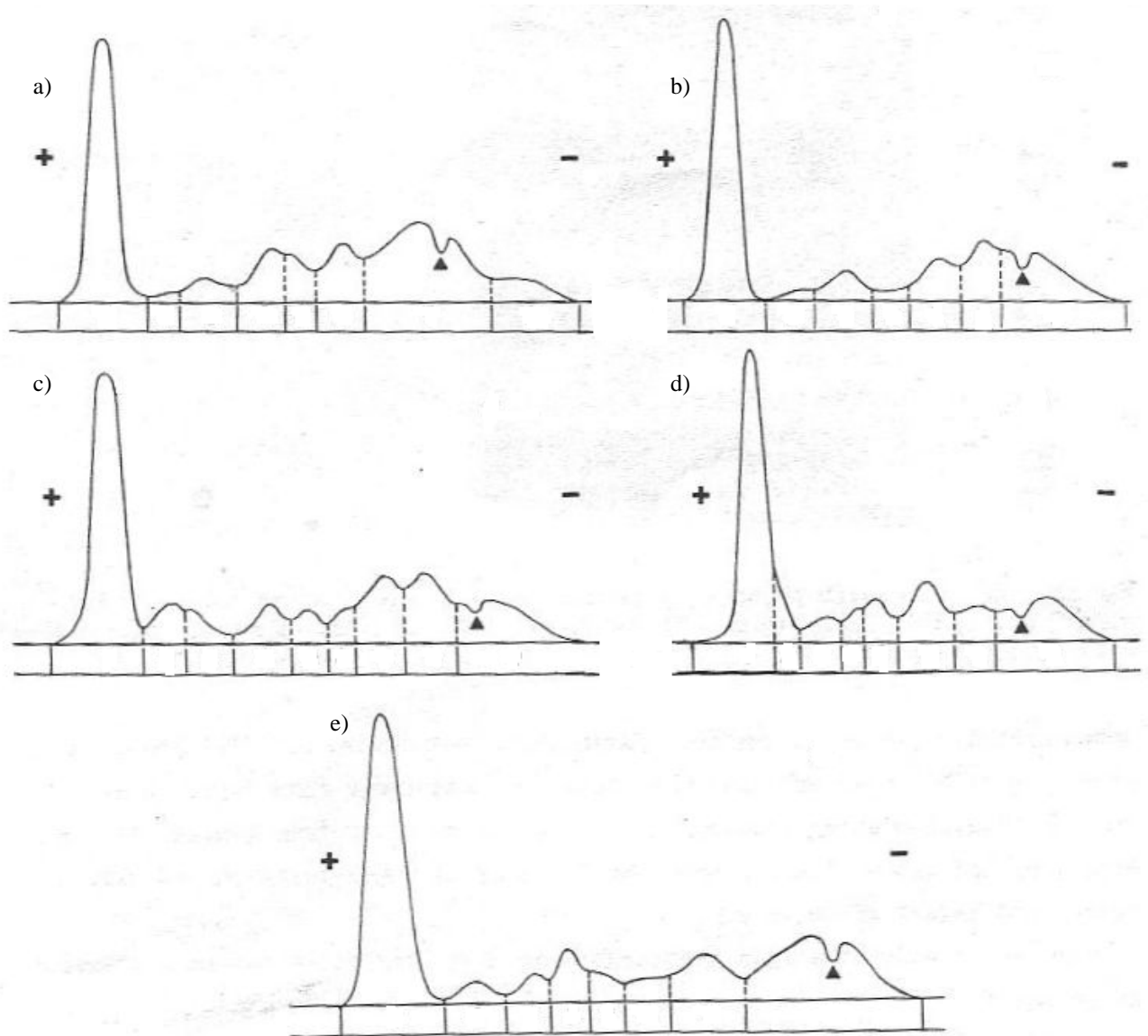
III. DISCUSSION

Il faut maintenant comparer nos résultats aux connaissances actuelles afin de pouvoir valider le protocole.

A. Validité des tracés obtenus

On peut trouver dans la littérature (KEAY et DOXEY, 1981) une description des caractéristiques du tracé des électrophorèses de protéines sériques des espèces étudiées dans notre travail. La figure 23 montre les tracés électrophorétiques normaux pour chaque espèce extraits de ces travaux.

Figure 23 : Tracés électrophorétiques normaux dans les espèces
a) ovine b) bovine c) féline d) équine e) canine (source : KEAY et DOXEY, 1981).
▲ point de dépôt de l'échantillon



∞ Dans l'espèce canine (figure 23e), les fractions α et β sont divisées en deux zones (α_1 , α_2 , β_1 et β_2). Les zones α_1 , α_2 et β_1 peuvent parfois même se séparer en deux parties (α_{1a} et α_{1b} pour α_1 , α_{2a} et α_{2b} pour α_2 , ...). La fraction γ ne contient qu'une zone.

Les tracés obtenus dans l'espèce canine avec notre protocole d'électrophorèse sont similaires aux caractéristiques décrites.

∞ Dans l'espèce féline (figure 23c), la fraction α se subdivise en deux zones α_1 et α_2 . Ces zones peuvent également être divisées en deux fractions α_{1a} et α_{1b} , α_{2a} et α_{2b} . La

fraction β se compose de deux zones β_1 et β_2 . La fraction γ ne contient qu'une zone se présentant sous la forme d'une bosse large.

Les tracés obtenus dans l'espèce féline avec notre protocole d'électrophorèse sont similaires aux caractéristiques décrites sauf pour la fraction β_2 qui se superpose à la fraction γ dans notre travail.

⌘ Dans l'espèce équine (figure 23d), la fraction α se subdivise en deux zones α_1 et α_2 . Ces zones peuvent également être divisées en deux fractions α_{1a} et α_{1b} , α_{2a} et α_{2b} . La fraction α_{1a} a la particularité de commencer dans la branche cathodique de l'albumine. La fraction β se compose de deux zones β_1 et β_2 . La fraction γ ne contient qu'une zone.

Les tracés obtenus dans l'espèce équine avec notre protocole d'électrophorèse sont similaires aux caractéristiques décrites.

⌘ Dans l'espèce bovine (figure 23b), les fractions α et β sont divisées en deux zones (α_1 , α_2 , β_1 et β_2). Il existe une large zone vide entre les fractions α et β . Cette région distingue spécifiquement les sérums de cette espèce. La fraction γ ne contient qu'une zone.

Les tracés obtenus dans l'espèce bovine avec notre protocole d'électrophorèse sont similaires aux caractéristiques décrites.

⌘ Dans l'espèce ovine (figure 23a), la fraction α se subdivise en deux zones α_1 et α_2 . Ces zones peuvent également être divisées en deux fractions α_{1a} et α_{1b} , α_{2a} et α_{2b} . La fraction β ne contient qu'une zone. La fraction γ se compose de deux zones γ_1 et γ_2 .

Les tracés obtenus dans l'espèce ovine avec notre protocole d'électrophorèse sont similaires aux caractéristiques décrites.

Avec notre protocole, nous n'observons pas les plus petites fractions (α_{1a} ...) sur les protéinogrammes. Notre protocole ne permet pas, pour l'espèce féline, de bien différencier la fraction β_2 de la fraction γ . L'augmentation du temps de migration pour cette espèce pourrait améliorer la différenciation des fractions et faciliter le travail du technicien.

En conclusion, nos résultats correspondent à ceux donnés par la littérature. Nous pourrions donc valider le protocole proposé pour une utilisation en pratique courante après avoir vérifié que les normes proposées sont conformes aux références de la littérature.

B. Valeurs usuelles

Le tableau 14 compare nos valeurs calculées avec les normes de référence communément utilisées (KANEKO *et al.*, 2008) pour chaque fraction et pour le rapport albumine/globuline dans chaque espèce.

Tableau 14 : Comparaison des valeurs usuelles calculées avec celles de la littérature (KANEKO *et al.*, 2008).

	ESPECE CANINE		ESPECE FELINE		ESPECE EQUINE	
	Thèse	Kaneko & al.	Thèse	Kaneko & al.	Thèse	Kaneko & al.
PROT. TOT.	63 – 79	54 – 71	53,8 – 71,0	54 – 78	48,6 – 71,3	52 – 79
ALBUMINE	27,8 – 37,5	26 – 33	28,2 – 34,2	21 – 33	22 – 26,4	26 – 37
ALPHA1	2,4 – 4,3	2 – 5	2,3 – 8,7	2 – 11	2,2 – 3,8	0,6 – 7
ALPHA2	8,8 – 16,3	3 – 11	4,8 – 7,4	4 – 9	7,7 – 11,8	3,1 – 13,1
BETA1	2,5 – 6,3	7 – 13	5,8 – 10,9	3 – 9	5,7 – 9,4	4 – 15,8
BETA2	10,7 – 11,7	6 – 14	1,1 – 3,0	6 – 10	2,3 – 6,4	2,9 – 8,9
GAMMA	4,2 – 9,3	9 – 22	5,0 – 13,2	17 – 44	4,7 – 17,4	5,5 – 19
Alb / Glob	0,7 – 1	0,59 – 1,11	0,88 – 1,12	0,5 – 1,4	0,5 – 0,9	0,62 – 1,46

	ESPECE BOVINE		ESPECE OVINE	
	Thèse	Kaneko & al.	Thèse	Kaneko & al.
PROT. TOT	55,9 – 74,4	67,4 – 74,6	62,6 – 79,4	60 – 79
ALBUMINE	24,4 – 34,1	30,3 – 35,5	23,4 – 30,8	24 – 30
ALPHA1	2,1 – 4,3	7,5 – 8,8	1,8 – 3,8	3 – 6
ALPHA2	5 – 7,3		6,6 – 9,7	
BETA1	5,1 – 7,9	8 – 11,2	1,6 – 10,5	7 – 12
BETA2	2,4 – 6,9			4 – 14
GAMMA	10,1 – 20,7	16,9 – 22,5	16,9 – 36,9	7 – 22
				2 – 11
Alb / Glob	0,5 – 1,1	0,84 – 0,94	0,4 – 0,9	0,42 – 0,76

En observant le tableau 14, on remarque que nos valeurs usuelles calculées sont assez proches des valeurs de référence proposées par Kaneko *et al.* (2008). Cependant il faudrait soumettre à nouveau des sérums d'autres individus sains pour chaque espèce afin de consolider ce travail (la taille d'un groupe d'échantillon est au maximum de 12, et le plus souvent inférieur à 10, quelle que soit l'espèce considérée).

C. Le protocole proposé

La durée des manipulations (de la centrifugation à l'impression des résultats) est d'environ 1h30. Le technicien en charge de ces analyses est donc occupé pendant cette durée. Cela représente un temps de manipulation long pendant lequel certaines étapes sont critiques. Ces étapes sont au nombre de 3 : le placement du gel sur le bloc réfrigérant, la coloration et enfin l'interprétation des protéinogrammes.

Entre le gel et le bloc réfrigérant se trouve un liquide conducteur. Le placement du gel nécessite un soin particulier. En effet aucune bulle d'air ne doit persister entre le gel et le bloc. Dans le cas contraire, un échauffement et une dénaturation de protéines pourraient se produire. Cela fausserait la migration.

La coloration est une autre étape importante. Un défaut ou un excès de coloration peut aussi fausser l'analyse. Le logiciel utilise l'intensité de la coloration pour calculer les concentrations. Un séchage incomplet après la coloration engendre la persistance d'un fond coloré. Cela entraîne une interférence lors de l'intégration de l'électrophorégramme par le logiciel.

Enfin l'interprétation du protéinogramme par le technicien est l'étape la plus critique. Bien que le logiciel reconnaisse les pics automatiquement, c'est au technicien d'attribuer les différents pics d'après son analyse du profil. Une erreur lors de l'interprétation fausserait les résultats.

D. Difficultés liées à l'utilisation du logiciel

Le logiciel Platinum 3® utilisé pour ce travail est un logiciel adapté à la médecine humaine. Il ne gère donc pas plusieurs espèces. Il a donc fallu créer un profil spécifique pour chaque espèce afin d'enregistrer les normes correspondantes à chaque espèce.

La sélection du profil se fait avant la numérisation. Dans le cas d'une plaque avec des sérums issus d'espèces différentes (6 sérums possibles par plaque), les normes utilisées par le logiciel sont celles correspondantes au profil sélectionné et s'appliquent à l'ensemble de la

plaque. Elles sont donc valides uniquement pour les migrations de sérums dont l'espèce correspond au profil sélectionné.

Deux solutions sont possibles avec ce logiciel. Soit on n'assigne qu'une seule espèce par plaque de migration, mais cela augmente le coût de revient des analyses, soit le technicien renouvelle la numérisation de la plaque autant de fois qu'il y a d'espèces. C'est donc du temps et des manipulations supplémentaires pour lui.

On pourrait éviter ces désagréments supplémentaires s'il existait un logiciel adapté à la médecine vétérinaire en gérant les espèces multiples. Il suffirait que le choix des normes à utiliser se fasse après la numérisation et pour chaque migration et non pour l'ensemble de la plaque de migrations comme c'est le cas pour le logiciel Platinum 3®.

CONCLUSION

Les électrophorèses des protéines sériques aident le praticien dans sa démarche diagnostique, et lui permettent de juger de l'efficacité du traitement et de suivre l'évolution d'une maladie inflammatoire chronique. En améliorant la performance de son matériel pour les électrophorèses des protéines, l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort permet aux cliniciens d'avoir accès à des analyses plus robustes.

Notre travail a permis de paramétrer à la fois le protocole pour réaliser ces électrophorèses et le logiciel d'intégration permettant leur analyse.

Les tracés obtenus sont conformes aux données de la littérature et le protocole est donc utilisable pour une utilisation de routine. Ce travail a fait l'objet d'une présentation sur poster (Annexe) au congrès « spectrométrie de masse et analyse protéomique » de Dijon (septembre 2009).

Le faible effectif des échantillons utilisés dans ce travail nécessiterait toutefois de compléter l'échantillonnage avec de nouveaux sérums pour chaque espèce afin d'améliorer la précision des intervalles.

Enfin l'électrophorèse peut être utilisée sur d'autres liquides biologiques comme les urines et le liquide céphalorachidien ou couplée à des techniques immunochimique pour identifier plus précisément des protéines. Elle peut aussi être utilisée pour d'autres espèces animales telles le furet, les lagomorphes...Ce travail peut servir de base en adaptant le protocole aux conditions nécessaires à l'analyse de ces liquides ou aux techniques immunochimiques. L'utilisation chez d'autres espèces nécessitera aussi un travail pour définir des valeurs usuelles chez chacune d'entre-elles.

[MCours.com](https://www.mcourses.com)