

SECONDE PARTIE

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE L'ÉLECTROPHORÉSE DES PROTÉINES SÉRIQUES SUR GEL D'AGAROSE

I. Matériels et méthodes

A. Les animaux

Pour cette étude, nous nous sommes intéressés aux espèces canine, féline, équine, bovine et ovine. Les animaux retenus présentent un examen clinique normal et sont considérés comme des sujets sains.

Dans l'espèce canine, les chiens sont des Beagles appartenant à l'unité pédagogique de la Reproduction de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Six individus sont retenus. Ce sont des femelles âgées de 2 à 10 ans.

Les chats sont tous des chats de race commune présentés au service de chirurgie pour y subir une stérilisation de convenance. Onze individus sont retenus. Il s'agit de cinq mâles et six femelles âgés de 10 mois à 6 ans.

Les chevaux sont des Selles Français sains prélevés pour les besoins d'un autre travail (CORNUS, 2010). Nous avons utilisé douze sérums différents provenant de neuf mâles et trois femelles âgés de 2 à 20 ans.

Les bovins sont des Prim'holstein, race laitière, mises à notre disposition par M. Lefort éleveur à Arvillers (Somme). Douze individus ont été prélevés. Il s'agit de douze femelles âgées de 3 à 7 ans.

Les moutons sont des Suffolks provenant de l'EARL Agri-Smessaert à Catigny (Oise). Douze individus ont été prélevés : onze femelles et un mâle âgés de 1 à 8 ans.

B. Prélèvements des animaux

On prélève 5mL de sang sur tube sec au niveau de la veine jugulaire chez toutes ces espèces sauf les bovins, chez lesquels le prélèvement a lieu au niveau de la veine caudale. Les prélèvements sont laissés au repos pendant 20 minutes pour que s'effectue la coagulation. Après centrifugation à 3000 tours par minute pendant 10 minutes, on obtient les sérums pour la réalisation des électrophorèses.

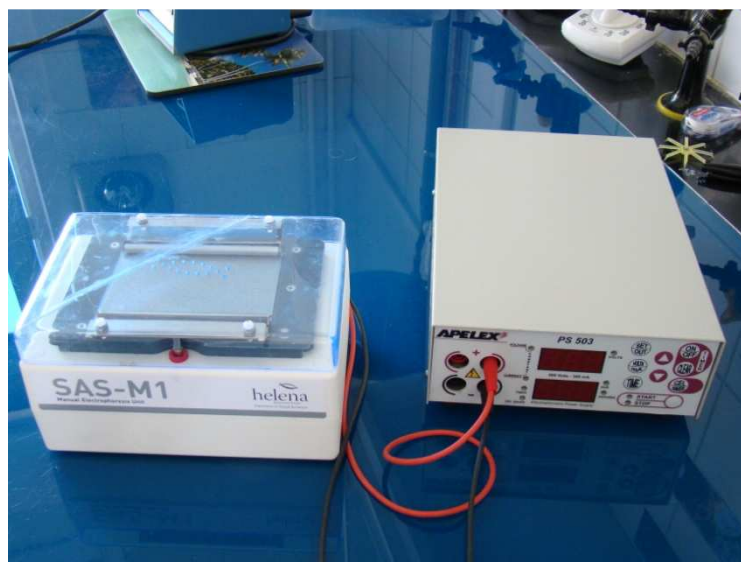
Les sérums présentant un aspect trop hémolysé ou opalescent sont écartés car les résultats de leur électrophorèse sont faussés par apparition de complexe inter-protéique (ex : complexe haptoglobine-hémoglobine lors de sérums hémolysé visible par un pic au niveau des α_2 -globulines).

Avant de réaliser les électrophorèses, on pratique sur chaque sérum un dosage des protéines totales. Ce dosage est réalisé grâce à un automate de biochimie Prestige 24I de Tokyo Boeki par une méthode colorimétrique de Biuret. Les kits de réactifs sont des kits Spinreact Total Protein® fournis par Kitvia.

C. Electrophorèse en gel d'agarose et réalisation de l'électrophorégramme

On réalise les électrophorèses sur le système manuel SAS-M1 (Helena Biosciences, Gateshead, Royaume-Uni) alimenté par un générateur de courant Apelex PS 503 (Apelex, Massy, France) présenté sur la figure 5.

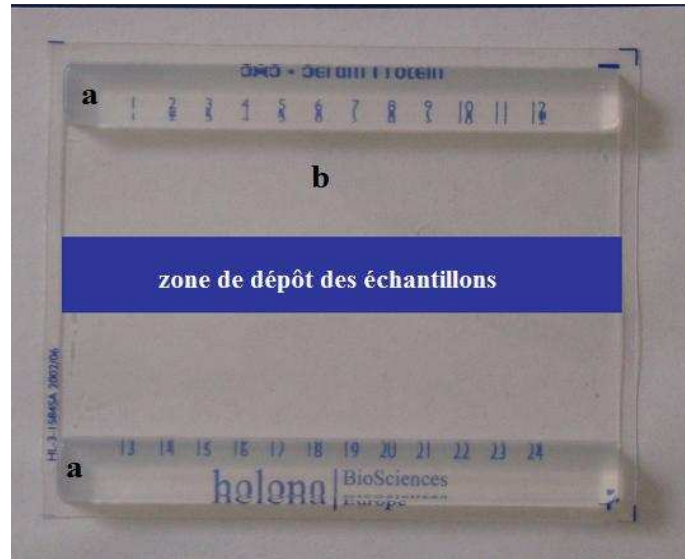
Figure 5 : Cuve à électrophorèse manuel SAS-M1 et son générateur Apelex PS 503.



Les gels de migration utilisés sont les gels d'agarose SAS - Serum Protein (Helena Biosciences) présentés sur la figure 6.

Figure 6 : Gel de migration SAS - Serum Protein.

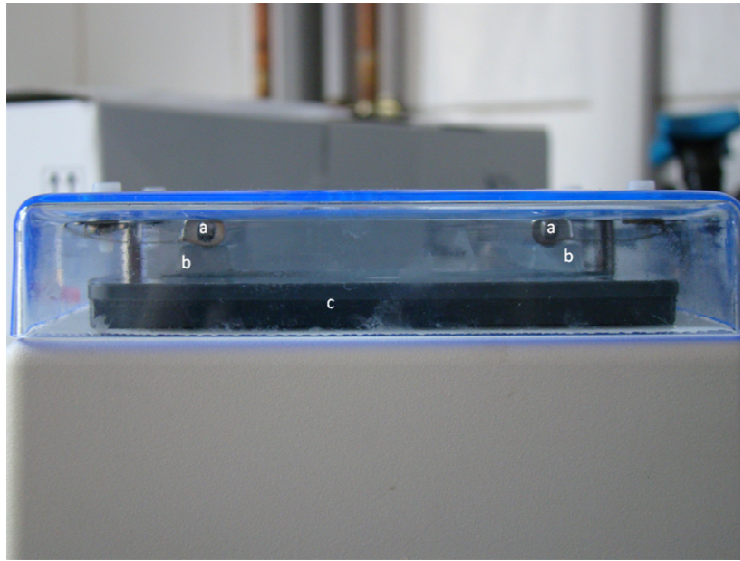
a : ponts d'agarose, **b :** zone de migration



Les sérums sont dilués. A l'aide d'un masque fenêtré appliqué sur le centre du gel, on dépose 5 microlitres d'échantillons. On peut déposer au maximum six échantillons sur le gel. Puis le gel est placé sur le bloc réfrigérant de la cuve d'électrophorèse et les électrodes du couvercle sont mises en contact avec les ponts d'agarose en refermant le système comme le montre la figure 7.

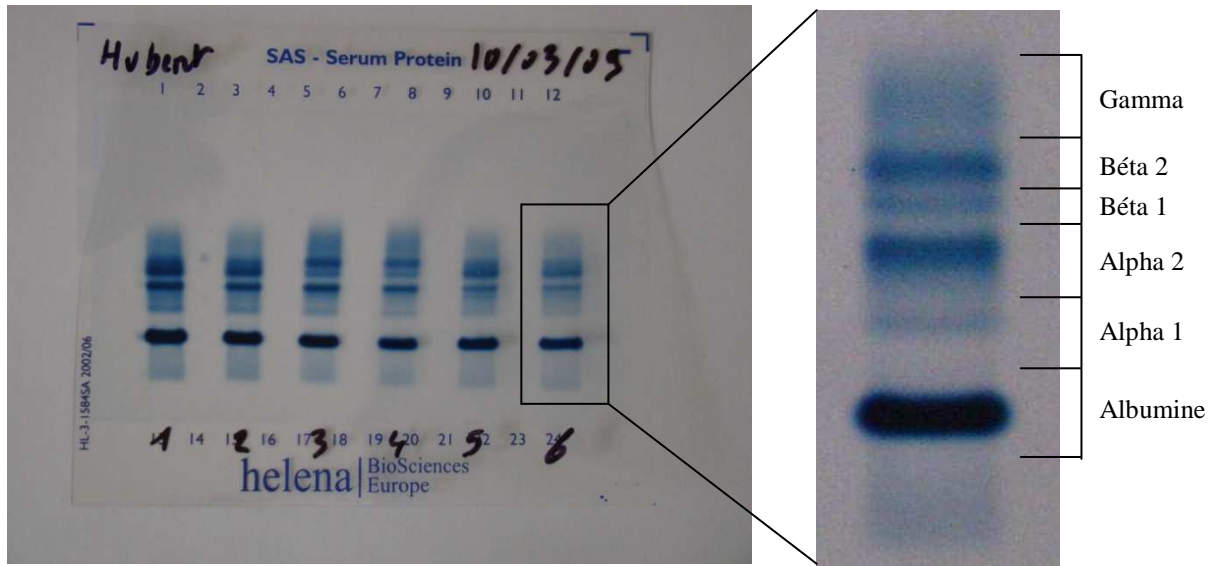
Figure 7 : Gel en place dans la cuve d'électrophorèse.

a : électrodes, **b** : ponts d'agarose en contact avec les électrodes, **c** : bloc réfrigérant



Les gels sont soumis à un courant de 80 volts de tension pendant 30 minutes pour réaliser la migration des protéines. Ils sont ensuite plongés dans une solution de coloration d'acide bleu (Helena Biosciences) pendant 10 minutes. Après rinçage à l'eau distillée pendant une minute, ils sont séchés, puis plongés durant deux périodes de 3 minutes dans une solution de décoloration (Helena Biosciences). Ils sont à nouveau séchés après un rinçage d'une minute dans de l'eau distillée. La figure 8 présente un gel après cette étape de coloration et séchage et une visualisation des fractions protéiques.

Figure 8 : Aspect d'un gel après coloration et visualisation des fractions protéiques.
6 sérums numérotés de 1 à 6 ont été soumis à l'électrophorèse.



Les gels sont ensuite numérisés dans un scanner Epson V500 photo puis analysé par le logiciel d'intégration Platinum 3® (Helena Biosciences).

D. Etude de la dilution des sérums

Les caractéristiques de la dilution utilisée peuvent influencer les résultats des protéinogrammes. Le constructeur préconise une dilution au quart avec une solution de chlorure de sodium à 0,9%.

Pour des raisons pratiques, on souhaite utiliser de l'eau distillée comme solvant. Nous comparons donc des protéinogrammes de sérums dilués soit avec de l'eau distillée soit avec du chlorure de sodium (NaCl 0,9%, Aguettant, Lyon, France).

Les préconisations du constructeur quant au degré de dilution s'appliquent aux sérums d'origine humaine. Le degré de dilution doit être étudié afin de déterminer une dilution optimale dans le cas de sérums d'origine animale. Des sérums sont donc dilués au quart, au cinquième et au huitième puis subissent une électrophorèse selon le protocole présenté. Les protéinogrammes sont ensuite comparés grâce au logiciel.

E. Intégration des protéinogrammes et intervalles de confiance

Tous les sérums des animaux sains sont maintenant dilués puis soumis à l'électrophorèse des protéines sériques. Ils sont ensuite numérisés et intégrés avec le logiciel Platinum 3®. Les pics et fractions sont visualisés à l'écran et bornés par l'opérateur. A partir de la valeur de protéines totales mesurées et de l'aire sous la courbe définie par les bornes, le logiciel calcule les concentrations de chaque fraction.

En regroupant les valeurs obtenues pour chaque individu d'une même espèce, nous calculons pour chaque fraction la moyenne M , l'écart-type σ . On suppose une répartition gaussienne des valeurs dans une population, ainsi l'intervalle de référence (intervalle de confiance à 95%) se définit de la façon suivante $I = [M - 2\sigma, M + 2\sigma]$. Ces intervalles correspondent aux valeurs usuelles du protéinogramme pour notre méthode. Ils apparaîtront comme tels sur le rapport envoyé au clinicien.