



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Analyse Protéomique et Santé

Intitulé :

Recherche des biomarqueurs dans la salive et le sérum des patients atteints de la sclérose en plaques

Présenté et soutenu par : **BOUACIDA Kaltoum**
SAHLI Sara

Le : 01/07/2015

Jury d'évaluation :

Président du jury : BELLIL Inès (MCB- UFM Constantine).

Rapporteur : KHELIFI Douadi (Prof- UFM Constantine).

Examineur : GRAMMA Maamar (Chargé de cours- UFM Constantine).

Année universitaire
2014 – 2015

Remerciements

*Nous remercions **Dieu** le tout puissant, qui nous éclaire le bon chemin et tout ce qui nous semble sombre et flou.*

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer toutes nos profondes gratitude et remerciements à notre encadreur Monsieur KHELIFI. D Professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine, pour avoir accepté la responsabilité de diriger ce travail malgré ces nombreuses obligations.

Nous tenons à exprimer notre grande considération et nos profonds remerciements aux membres de jury qui nous ont fait l'honneur de juger notre travail.

Nos sincères remerciements et gratitude vont à Mademoiselle BELLIL. I pour avoir acceptée de présider le jury de ce mémoire.

Nos sincères remerciement et gratitude vont aussi à Mr. GRAMMA. M de nous avoir fait l'honneur d'examiner et de juger notre travail.

Nous tenons à remercier très spécialement M^{elle} MEDOURI Asma pour sa gentillesse et son aide particulière au cours de la réalisation de ce travail (depuis la pratique jusqu'à l'aboutissement du manuscrit), pour ses conseils avisés et pour ses encouragements, ainsi que ses critiques constructives pour nous diriger vers un esprit scientifique dont nous avons pu bénéficier, Merci pour ta disponibilité et efficacité. Merci Mademoiselle.

Nos remerciements vont particulièrement à, Pr HAMRI A, chef de service de neurologie CHU de Constantine. Vous avez toujours été disponible pour nous guider tout au long de notre parcours au niveau du service. Veuillez accepter l'expression de notre profond respect.

Nos remerciements s'adressent également à tout le personnel médical du service de Neurologie du CHU de Constantine ; Dr. SIFI, Mr. ABDELJALIL, et surtout Dr KHELLEF.

Nos remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Dédicace

A toutes les personnes qui ont contribués, de prés ou de loin, a l'élaboration de ce mémoire.

Tout particulièrement a ma petite famille,

À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, ma vie et mon bonheur, affable, honorable, Maman que j'adore.

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.

Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

À la mémoire de mon père,

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour,

L'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Pour m'avoir donné la vie et la joie de vivre, ta bonne éducation, tes conseils et tes bénédictions n'ont jamais fais défauts,

Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

Que dieu le tout puissant t'accorde son paradis éternel (ameen)

À Mon cher frère **Azzedine**

Je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

À ma très chère sœur **Houria**,

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour toi

Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.

Enfin je remercie tous mes ami(e)s...

En particulier, **Amira, Anissa, Kaltoum, Hadjer, Salah eddine**,...et tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer

Je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

SARA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes très chères parents Merci Papa et Maman de m'avoir soutenu et écouté avec tout votre cœur au cours de ces années d'études.

Vous avez toujours me montrer le côté positif des choses pour avancer, même quand c'était difficile. Merci d'avoir été des parents aussi disponibles et ouverts à toutes mes envies.

A mes très chères sœurs, mes chers frères, mes neveux et mes nièces et que Dieu les préserve.

A mon fiancer Chouaib pour son encouragement et son soutien moral,

A tous les membres de ma famille et surtout ma chère Lamia,

A mes chers ami (e)s, pour tous les moments que nous avons partagés,

A tous ceux qui m'aiment

A tous les malades de la sclérose en plaques

KALTOUM

Liste des abréviations

Introduction	1
---------------------------	---

Chapitre 1 : Revue bibliographique

I. La sclérose en plaque.....	3
1. Rappel sur le système nerveux central	3
1.1. Le neurone	3
1.2. Anatomie du neurone.....	3
1.3. La myéline	4
1.4. L'influx nerveux.....	4
2. La sclérose en plaques.....	5
2.1. Définition.....	5
2.2. Epidémiologie.....	5
2.3. Etiologie.....	6
2.4. Physiopathologie.....	6
2.5. Signes cliniques.....	7
2.6. Diagnostic.....	8
2.7. Evolution.....	8
2.7.1. <i>Forme rémittente, récurrente</i>	8
2.7.2. <i>Forme primaire progressive</i>	9
2.7.3. <i>Forme secondairement progressive</i>	9
II. La salive	9
1. Les glandes salivaires	9
1.1. <i>Les glandes parotides</i>	9

Sommaire

1.2. Les glandes sublinguales.....	9
1.3. Les glandes sous-maxillaires.....	9
2. La salive.....	9
2.1. Définition.....	9
2.2. Composition biochimique de la salive.....	10
2.3. Caractéristiques physicochimiques de la salive	12
2.4. Rôle de la salive	12

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Matériel biologique.....	14
1.1. Recrutement des patients.....	14
1.2. Recueil de la salive.....	14
1.3. Prélèvement sanguin.....	14
2. Méthodes.....	14
2.1. Préparation des échantillons.....	14
2.2. Electrophorèse verticale des protéines totales du sérum et de la salive par SDS-PAGE.....	15
2.2.1 Tampon de migration.....	15
2.2.2. Dépôt des échantillon.....	15
2.2.3 Conditions de migration.....	15
2.2.4. Fixation, coloration et décoloration.....	15
2.3. Lecture des électrophorégrammes.....	16
2.4. Analyse statistiques.....	16

Chapitre 3 : Résultats et discussion

I. Fractionnement des protéines et recherche de biomarqueurs.....	17
---	----

Sommaire

1. Analyse des protéines fractionnées par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes et réductrices.....	17
1.1. Les protéines salivaires.....	17
1.1.1. Etude de la variabilité des protéines salivaires dénaturées et réduites	20
a. Etude des protéines salivaires de HPM.....	20
b. Etude des protéines salivaires de FPM.....	22
1.1.2. Classification hiérarchique ascendante des patients.....	23
1.1.3. Indice de similarité des diagrammes protéiques salivaire.....	25
1.2. Les protéines sériques.....	27
Conclusion	30
Références bibliographiques	32
Annexes	
Résumés	

ABREVIATION

BHE : Barrière hémato encéphalique

CA : Cancer Antigen

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CPA : Cellules présentatrices de l'antigène

EBV : Epstein-Barr Virus

FPM : Faible poids moléculaire

hCG : hormone Chorionique Gonadotrope

HPM : Haut poids moléculaire

Ig G : Immunoglobuline type G

IL : Interleukine

INF γ : Interféron-gamma

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

MBP: Myelin basic protein

MOG: Myelin oligodendrocyte protein

OLS : Organes lymphoïdes secondaires

PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

PM : Poids moléculaire

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SEP : Sclérose en plaques

SNC : Système nerveux central

TNF : Tumor necrosis factor

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les maladies neurologiques regroupent sous cette même appellation des pathologies extrêmement variées dont les plus répandues sont des atteintes lésionnelles du système nerveux. Elles entraînent des troubles moteurs et/ou cognitifs, voir psychiatriques. Plus spécifiquement, les maladies inflammatoires du système nerveux central constituent un problème de santé publique surtout celles démyélinisantes dont la plus connue est la sclérose en plaques (SEP) [39].

La SEP est une maladie inflammatoire touchant le système nerveux central. Elle est caractérisée par le développement d'une réaction inflammatoire développée contre la myéline du système nerveux central qui constitue la gaine protégeant les fibres nerveuses dans le cerveau et la moelle épinière. C'est l'affection neurologique évolutive qui constitue la première cause de l'handicap sans traumatisme des adultes jeunes avec une prédominance féminine [41]. A l'échelle mondiale environ 2,3 millions cas ont été enregistrés [58]. En Algérie, peu d'études épidémiologiques sont réalisées, néanmoins environ 10000 malades atteints de sclérose en plaques en 2013 [9].

En règle générale, le diagnostic de la SEP est fondé sur la présence des troubles neurologiques qui régressent puis réapparaissent à des endroits imprévisibles. On peut parfois obtenir la confirmation par IRM (imagerie par résonance magnétique) [12], mais des examens biologiques (Analyse du liquide céphalorachidien) sont nécessaires pour affirmer ou infirmer le diagnostic nécessitant ainsi l'acte invasif de la ponction lombaire [12]. Ces dernières années, plusieurs outils du diagnostic biologique sont mis au point comme la technique d'immunotransfert après isoélectrofocalisation des protéines du sérum et du LCR pour démontrer la synthèse des IgG au sein du SNC [12, 15 et 28]. Etant un liquide biologique reflétant la composition protéique sanguine, la salive peut être une issue de recherche de biomarqueurs pour certaines maladies et dont le rôle a été déjà établi dans certaines maladies neurologiques telles que la maladie d'Alzheimer, et certains cancers tels que le cancer colorectal et dans le diabète avec ses deux types [60].

Dans les contextes précédents, ce travail consiste à investiguer et explorer le protéome salivaire des patients atteints de sclérose en plaques avec ses différentes formes évolutives et de le comparer à celui de leurs sérums par utilisation des techniques d'électrophorèse monodimensionnelle.

INTRODUCTION

La première partie de ce travail porte sur une revue bibliographique avec une présentation générale du système nerveux central, ainsi que des généralités sur la maladie. La deuxième partie présente les patients, le matériel biologique ainsi que l'ensemble des méthodes utilisées dans notre étude. Enfin, nos résultats seront discutés avec ceux de la littérature afférant à cette pathologie.

**REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE**

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La sclérose en plaques

1. Rappel sur le système nerveux central

Le SNC est constitué de l'encéphale (logé dans le crâne lui-même constitué du cerveau, du tronc cérébral et du cervelet) et de la moelle épinière (long cordon blanchâtre d'environ 45 centimètre de long située dans la colonne vertébrale) (figure 1) [40]. Il est entouré de trois enveloppes protectrices : les méninges constituées (de l'extérieur vers l'intérieur) de la dure mère, la pie mère et l'arachnoïde [29 et 48]. Le tissu nerveux est constitué de cellules nerveuses (neurones) et de cellules gliales (cellules de soutien), dont le neurone est l'unité fonctionnelle du SNC [8 et 23].

1.1. Le neurone

Le neurone constitue l'unité fonctionnelle du système nerveux. La cellule nerveuse est sensible aux changements de son environnement, ne se divise pas mais bénéficie d'une très longue durée de vie et, pour survivre, a besoin d'un apport continu d'oxygène et de glucose.

Tous les neurones ont une morphologie qui leur permet de transmettre l'influx nerveux. La forme et la taille des neurones sont variables, mais pas suffisamment pour que ces différences soient vues à l'œil nu [32].

1.2. Anatomie du neurone

Le neurone est composé d'un corps cellulaire, un axone (prolongement) et de dendrites (figure 2).

1.2.1. Le corps cellulaire

Contient un noyau, des organites intra cytoplasmiques et des corps de Nissl qui jouent un rôle dans la synthèse des protéines. Les corps cellulaires et les fibres amyéliniques forment la substance grise du système nerveux que l'on retrouve à la périphérie du cerveau et au centre de la moelle épinière.

Les regroupements des corps cellulaires sont nommés noyaux dans le système nerveux central et ganglions dans le système nerveux périphérique. Un neurone possède un seul axone (qui parfois comporte des ramifications collatérales).

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.2.2. L'axone

L'axone est un prolongement de quelques millimètres à un mètre de long. Les axones sont la structure conductrice du neurone, ils transmettent l'influx provenant du corps cellulaire qui va entraîner la libération des neurotransmetteurs. La membrane qui délimite l'axone est l'axolemme. Certains axones de gros calibre sont recouverts d'une substance lipidiques qui les protège et les isole, la myéline.

1.2.3. Les dendrites

Les dendrites sont des petites extensions du corps cellulaire qui reçoivent et transmettent l'influx nerveux à d'autres cellules nerveuses. Ce sont les structures réceptrices des signaux des autres neurones [32].

1.3. La myéline

La myéline est une substance isolante qui augmente la vitesse de conduction de l'influx nerveux.

Chimiquement, c'est un phosphoaminolipide, une substance isolante, formée à partir des prolongements des membranes plasmiques de cellules spécialisées : les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique et les oligodendrocytes dans le système nerveux central.

Il existe ainsi deux catégories de fibres nerveuses (figure 3) :

- Les fibres myélinisées entourées de myéline
- Les fibres amyéliniques dépourvues de myéline [52].

La myéline prévient les fuites de charges électriques engendrées par l'influx nerveux et permet une transmission rapide de cet influx ; la vitesse de transmission chez les axones non myélinisés est significativement plus faible :

- Fibres A myélinisées de gros diamètres: 12 à 130 m/s.
- Fibres B myélinisées de petit diamètre: environ 15 m/s.
- Fibres C amyélinisées: 0.5 à 2 m/s [32].

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.4. L'influx nerveux

C'est le déplacement d'une onde électronégative ou potentiel d'action qui se propage dans un neurone [47]. Les neurones communiquent entre eux ou avec les cellules effectrices cibles au moyen de signaux électriques. Les potentiels d'action, qui se propagent le long de leur axone. Du fait de sa structure et de sa composition, la gaine de myéline possède une résistance électrique beaucoup plus élevée que la membrane de l'axone. Lorsqu'à un nœud de Ranvier de la membrane axonale est dépolarisée, le potentiel d'action qui y est produit ne peut pas gagner la zone adjacente recouverte de myéline et va se propager en « sautant par bonde » de nœud en nœud (figure 4) : c'est la conduction saltatoire [54].

La myélinisation, dont le rôle est de former un isolant électrique autour de certains axones, présente trois avantages principaux pour le système nerveux des vertébrés : rapidité et fidélité de la transmission nerveuse sur de longues distances ; économie d'énergie du fait que les échanges ioniques se produisent uniquement au nœud de Ranvier. Un axone myélinisé conduit l'influx nerveux environ dix fois plus vite qu'un axone non myélinisé de même taille [54].

2. La sclérose en plaques

2.1. Définition

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire chronique auto-immune du système nerveux central [5] qui se caractérise par un certain nombre de troubles cliniques ayant pour cause la présence, sur les fibres nerveuses, de multiples plaques de démyélinisations (figure 5) disséminées dans la substance blanche sans ordre particulier, se succédant dans le temps [5]. Elle se déclare le plus souvent entre 20 et 40 ans et est marquée par des déficits neurologiques débutant de façon abrupte et persistant généralement pendant quelques jours ou quelques semaines avant de connaître une rémission [42].

2.2. Epidémiologie

A l'échelle mondiale environ 2,3 millions cas ont été enregistrés [58]. En Algérie, peu d'études épidémiologiques sont réalisées, néanmoins environ 10000 malades atteints de

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

sclérose en plaque sont recensait et nécessitent une prise en charge pluridisciplinaire pour éviter le handicap moteur [9].

La SEP peut affecter indifféremment les deux sexes mais il existe une prépondérance féminine: le sex-ratio est de un homme pour deux femmes [5]. Il s'agit en générale d'une maladie de l'adulte jeune, les premières manifestations débutantes dans 70% des cas entre 20 et 40 ans. Néanmoins, il existe des formes débutant chez l'enfant ou après 50 ans [5].

La maladie a une distribution géographique, suggérant l'intervention de facteurs exogènes : sa fréquence varie en fonction de la latitude avec une prévalence plus élevée dans les pays à forte latitude, particulièrement dans l'hémisphère nord. Il existe ainsi :

- Des pays à forte prévalence (30 à 80/100000 : nord des Etats Unis et de l'Europe, Canada du sud, mais aussi Australie et Nouvelle-Zélande),
- Des pays à prévalence moyenne (Sud des Etats Unis).
- Des pays à faible prévalence (< 5/100000 : Asie, Afrique noire, Tropicque...).

En France, la prévalence est d'environ 30 à 50/100000, alors qu'elle est supérieure à 100/100000 en Ecosse et inférieure à 2/100000 au Japon [5].

Les études de migrants ont permis de suggérer que les migrations avant l'âge de 15 ans conféraient le risque du pays receveur, alors que les adultes migrants conservent le risque de leur pays d'origine. Ces données sont en faveur de l'existence d'un facteur exogène, lié à l'environnement, qui interviendrait dans la genèse de la maladie dès l'enfance [5].

2.3. Etiologie

L'étiologie exacte de la SEP demeure inconnue [53]. La SEP est une maladie multifactorielle due à des facteurs génétiques et environnementaux.

La SEP n'est pas une maladie héréditaire, la prédisposition génétique a été suggérée en reposant sur l'existence de formes familiales de SEP (5 à 10% des cas) [6] et l'appartenance des sujets atteints à certains groupes ethniques (race blanche) et génétiques (HLA-DR2) [50].

Les facteurs environnementaux sont variés : l'intervention d'une infection virale dont le plus soupçonné est l'EBV [11, 12], la carence en vitamine D [10, 16 et 37], le tabagisme, la vaccination contre l'hépatite B et le niveau d'hygiènes [22, 13 et 37]. Les symptômes de la SEP est très souvent aggravés lors de l'augmentation de la température corporelle (lors d'un effort physique ou d'un bain chaud) [7 et 55].

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.4. Physiopathologie

La physiopathologie exacte de la SEP reste à préciser [10 et 56], il est admis que sa pathogénèse se déroule dans plusieurs étapes (figure 6) :

La première phase de la formation d'une plaque est une réaction inflammatoire. Chez un sujet génétiquement prédisposé, des lymphocytes T CD4⁺ auto réactifs spécifiques du SNC sont activés via un antigène inconnu dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) par des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) le plus souvent macrophages. Les lymphocytes T activés quittent les OLS d'où ils sont véhiculés vers la circulation sanguine périphérique avec des lymphocytes B et des macrophages pour traverser la barrière hémato encéphalique (BHE) [26].

Après la migration dans le SNC, les lymphocytes T activés (possédant des récepteurs reconnaissant des antigènes de la myéline : MBP et MOG) sont réactivés par des CPA locales (microglie et macrophages) provoquant leurs prolifération clonales entrant en voies Th1 (voie pro inflammatoire) et Th2 (voie anti inflammatoire) [7 et 26].

Les cytokines pro inflammatoires produits par les lymphocytes Th1 (IL-2, IFN- γ , TNF- α , LT) activent les macrophages et la microglie pour renforcer la phagocytose de la myéline. Les cytokines anti inflammatoires de la voie Th2 (IL-4, 5 et 6) activent les lymphocytes B qui se multiplient et élaborent des anticorps diversifiés, notamment des anticorps anti myéline (anti-MBP et anti-MOG) [55 et 57]. Certains anticorps attaquent la myéline, d'autres activent le complément pour favoriser la dégradation de la myéline et la libération de nouvelles molécules antigéniques (notamment la MBP et la MOG) qui alimentent le cercle vicieux de la maladie [26 et 33].

Une gliose cicatricielle irréversible synthétisée par les astrocytes s'installe progressivement donnant l'aspect d'une plaque à la nécrose [44, 14 et 20]

2.5. Signes cliniques

Les signes cliniques de la sclérose en plaques dépendent du siège des lésions. Parmi les plus communs, on peut signaler [42] :

Les troubles visuels: la névrite optique rétrobulbaire, se traduit par une baisse relativement brutale de l'acuité visuelle d'un œil, souvent ressentie par le patient comme une impression de tache au point de fixation (scotome central).

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Les troubles sensitifs: les paresthésies sont très fréquentes, pouvant toucher un ou plusieurs membres, le tronc ou la face, il peut s'agir de fourmillement, de sensations de brûlures ou de froid, de ruissellement, de peau cartonné.

Les troubles moteurs: il s'agit de troubles pyramidaux affectant notamment les membres inférieurs, se traduisant par une impression de lourdeur et de raideur à la marche. Parfois les troubles n'apparaissent qu'à l'effort.

Troubles cérébelleux : ils entraînent une incoordination des membres et /ou une instabilité à la station debout [24].

2.6. Diagnostic

Le diagnostic de la sclérose en plaque est basé sur l'examen clinique, et sur l'exclusion d'autres causes de lésions neurologiques multifocales. Certaines démarches diagnostiques sont particulièrement utiles.

L'**IRM** cérébrale peut montrer de multiples petites anomalies de signal dans la substance blanche cérébrale et médullaire (figure 7) ; les lésions récentes prennent le gadolinium.

L'examen du **liquide céphalo-rachidien** montre une augmentation discrète des lymphocytes et des protéines, avec une glycorachie normale. L'activation du système immunitaire au niveau du système nerveux centrale peut être mise en évidence par la présence de bandes clonales d'immunoglobulines par électrophorèse du liquide céphalorachidien [51].

2.7. Evolution

Trois formes principales de SEP sont individualisées en fonction de l'évolution de la maladie dans le temps (figure 8).

2.7.1. *Forme rémittente, récurrente*

Dans 85% à 90% des cas, la maladie débute par la forme rémittente caractérisée par des poussées entrecoupées de rémission. Une poussée est définie comme une période de survenue de nouveaux signes neurologiques ou de réapparition d'anciens symptômes durant au moins 24h, séparée de la poussée précédente d'au moins 1 mois. En général, les poussées durent de quelques jours à 1 mois, puis disparaissent progressivement.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.7.2. *Forme primaire progressive (ou progressive d'emblée)*

Cette forme se caractérise par une évolution lente et constante de la maladie, dès le diagnostic. Elle concerne 10% des cas. Il n'y a pas de véritable poussée. Bien que la maladie puisse s'aggraver par moments. Cette forme apparaît généralement plus tard dans la vie, vers l'âge de 40 ans.

2.7.3. *Forme secondairement progressive*

Après une forme rémittente initiale, la maladie peut s'aggraver de façon continue. On parle de forme secondairement progressive. Des poussées peuvent survenir, mais elles ne sont pas suivies de rémissions franches et le handicap s'aggrave peu à peu. La plupart des personnes présentant une forme rémittente évolueront vers une forme progressive dans les 15 ans qui suivent le diagnostic de la maladie [36].

II. La salive

1. Les glandes salivaires

Les glandes salivaires sont annexées à la cavité buccale et sécrètent la salive. Trois principales paires de glandes salivaires : parotides, sous-maxillaires et sublinguales sécrètent la salive (figure 9). La sécrétion de la salive est indispensable à la parole, à la mastication, au goût et à la déglutition [1 et 18].

1.1. Les glandes parotides, contenues dans une capsule fibreuse, sont situées en dessous et en avant des oreilles. Ce sont les plus grosses glandes salivaires produisant seulement 25 % de la salive [2 et 59].

1.2. Les glandes sublinguales sont situées à la base de la langue dans le plancher de la bouche. Elles produisent une petite quantité de salive épaisse, qui pénètre dans la bouche par de petits canalicules [21 et 27].

1.3. Les glandes sous-maxillaires sont situées sous le maxillaire et leur conduit pénètre dans la bouche de chaque cote du frein de la langue. La plupart de la salive est produite par ces glandes qui sont aussi innervées par le nerf facial.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2. La salive

1.1. Définition

La salive est la première sécrétion digestive, elle désigne un liquide physiologique incolore, alcalin, légèrement visqueux sécrété dans la bouche par les glandes salivaires [18]. La salive est essentiellement composée d'eau (99%), d'électrolytes, et d'une quantité variable de mucus.

Elle est sécrétée par les trois paires de glandes principales (parotides, sous-maxillaires et sublinguales) et une multitude de glandes accessoires disséminées dans la muqueuse buccale.

1.2. Composition biochimique de la salive

D'un point de vue biochimique, la salive constitue un milieu extrêmement complexe qui joue un rôle capital en physiopathologie buccale. Un grand nombre de molécules biologiques y a pu être identifié schématiquement, on peut définir dans la sécrétion salivaire : des constituants inorganiques anionique et cationique dont les plus importants sont les ions bicarbonates et phosphates ainsi que des constituants organiques qui confèrent à la salive de nombreuses propriétés [18].

1.2.1. L'eau : constitue 99% de la salive dont le rôle est l'humidification du bol, la solubilisation des substances ce qui permet de détecter le goût.

1.2.2. Constituants inorganiques : sont les électrolytes : Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- dont la composition varie pendant la sécrétion (tableau 1). Certains de ces ions permettent de réguler le pH du milieu buccal et qui ont une action bactériostatique.

1.2.3. Protéines salivaires

Les protéines salivaires représentent la majeure partie des constituants organiques. On distingue les protéines extrinsèques issues du sérum et les protéines intrinsèques synthétisés par la glande.

a- Protéines intrinsèques

- **L' α amylase :** une enzyme protéique de la famille des hydrolases, catalysant principalement l'hydrolyse de l'amidon en le clivant en maltose un disaccharide fait de deux molécules de glucose. Elle est produite par les glandes salivaires et les glandes pancréatiques.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

- **La lipase linguale** : est une enzyme salivaire sécrétée par des glandes de la langue, hydrolyse les triglycérides et libère des acides gras à longue chaîne (AGLC) dans la salive.
- **Les mucines** : sont des glycoprotéines du mucus, responsables des propriétés viscoélastiques et gélifiantes de celui-ci. Le caractère visqueux, facilite l'ingestion du bol alimentaire en l'imprégnant. Les mucines sont capables d'interagir avec des microorganismes en les agglutinant. Elles participent à la protection des muqueuses.
- **Le lysozyme** : est une protéine globulaire formée de 129 acides aminés (chez l'être humain) retrouvée dans la plupart des sécrétions de l'organisme (salivaires, lacrymales, nasales, bronchiques). Dans la salive, elle représente près de 10% des protéines totales. Le lysozyme a une action antibactérienne importante dans la salive. Il hydrolyse les liaisons β -(1-4) entre acide N- acetylmuramique et N-acetylglucosamine.

b- Protéines extrinsèques

On trouve parmi les protéines extrinsèques les immunoglobulines, dont le rôle dans le contrôle immunologique des bactéries est bien connu. L'IgA monomérique, qui est la plus représentée, dérive du sérum et gagne la cavité buccale de façon trans-épithéliale ou par le fluide gingival. On trouve également des IgG et des IgM. Des albumines issues du sérum sont également détectées dans la salive [25].

1.2.4. Autres constituants organiques

- Des facteurs de croissance telle que : EGF et NGF (substance à activité humorale dans les glandes salivaires).
- Des IgA sécrétoires dont la production peut être induite après stimulation du système lymphoïde annexé au système digestif.
- Des protéines riches en proline, des composés azotés tels que l'urée
- Des glucides libres sous forme de traces, des vitamines

Des lipides qui peuvent jouer un rôle important en se liant à des protéines salivaires [18 et 19].

1.3. Caractéristiques physicochimiques de la salive

Le volume : d'une personne à l'autre, la sécrétion peut varier de 500 à 1 200 ml par jour, 70 % d'origine parotidienne, 20 % submandibulaire (la production des autres glandes étant relativement négligeable) [59].

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La viscosité : la viscosité salivaire est le reflet du taux de mucines. Elle varie selon la localisation du prélèvement et le débit salivaire [59].

Le pH : il exprime l'acidité ou l'alcalinité de la salive et varie en fonction de l'âge, du lieu de prélèvement buccal et de l'alimentation. Le pH physiologique d'un individu varie dans une gamme normale comprise entre 5,6 et 7 avec une valeur moyenne d'environ 6,7 [59].

Le pouvoir tampon : la salive possède un pouvoir tampon qui est essentiellement assuré par les phosphates, les bicarbonates et certaines protéines. Le pouvoir tampon de la salive augmente avec la stimulation, il est presque inefficace pendant les périodes de faible débit (le pH salivaire peut descendre alors à un niveau de 5,3) [1].

Le débit salivaire : il reflète la production quantitative de la salive. Il est sous l'influence de multiples facteurs tels que le degré d'hydratation, la position du corps, l'exposition à la lumière, les stimulations antérieures, les rythmes circadien et circannuel, la taille des glandes et les médicaments ou drogues. Le débit salivaire augmente avant le repas alors qu'il est très réduit lors du sommeil, la déshydratation et le stress réduisent aussi le débit [18].

1.4. Rôle de la salive

Les enzymes salivaires participent au premier stade de la digestion. La salive a également une fonction mécanique qui nous permet de goûter, de mastiquer et déglutir les aliments solides. Elle agit comme un solvant et un lubrifiant dont les qualités physiques sont améliorées par la présence de mucine [1]. Aussi la salive est la cause essentielle de la très grande résistance de la cavité buccale à l'infection. Son action est aussi bien physique, car elle permet l'auto-nettoyage de la cavité buccale et l'humidification des muqueuses, qu'antibactérienne par la présence de lysozyme, et d'immunoglobulines. Le flux salivaire est un facteur important à évaluer, car de lui dépendent tous les autres facteurs salivaires qui participent à la protection des tissus buccaux. Il existe d'ailleurs une corrélation entre le nombre de caries dentaires et le flux salivaire. Et enfin la fonction de cicatrisation, la salive contient des facteurs de croissance qui interviennent dans la cicatrisation des tissus, on trouve notamment EGF.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

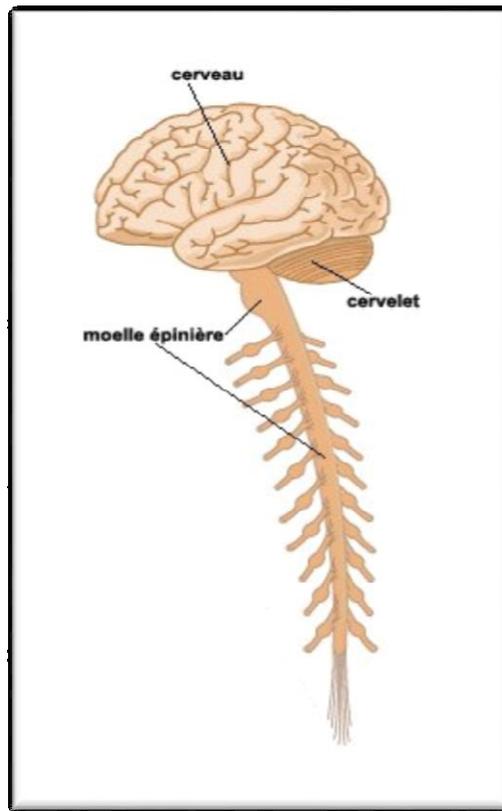


Figure 1 : système nerveux central [4].

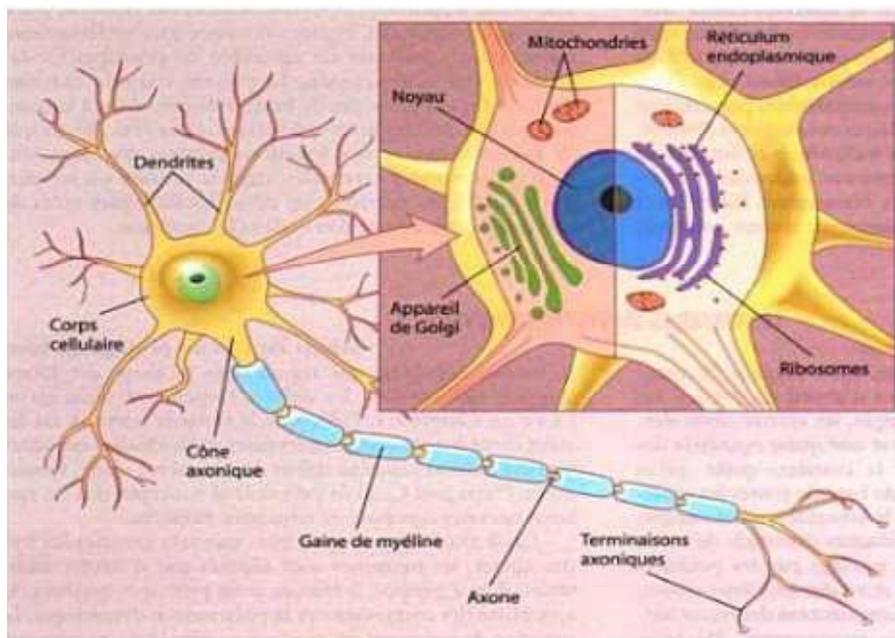


Figure 2 : Structure d'un neurone [32].

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

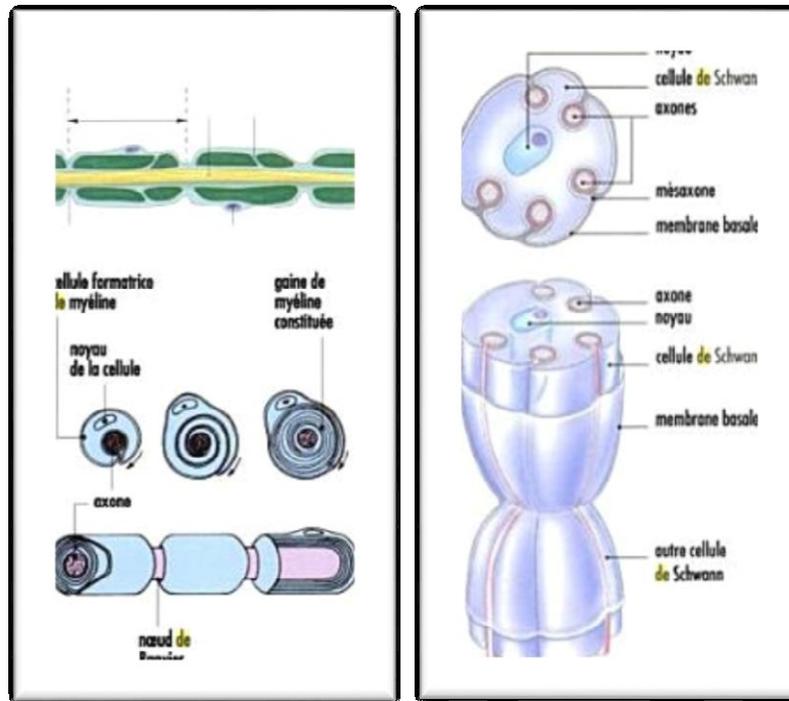


Figure 3 : Structure d'une fibre myélinisée et une fibre amyélinique [52].

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

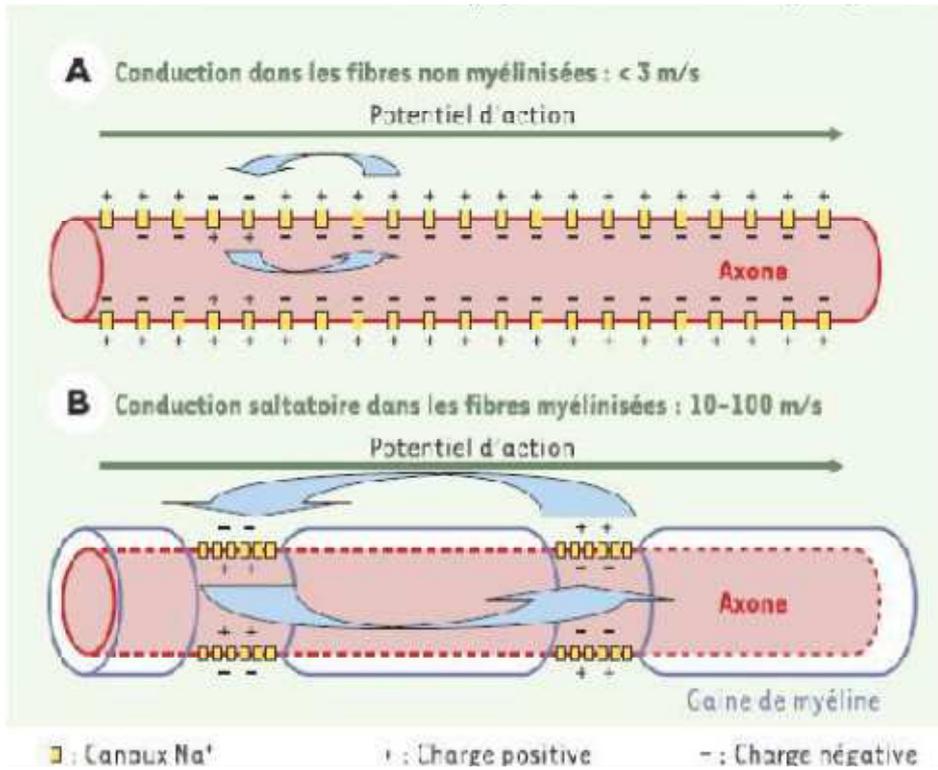


Figure 4 : Conduction de l'influx nerveux dans les fibres myélinisées et non myélinisées [38].

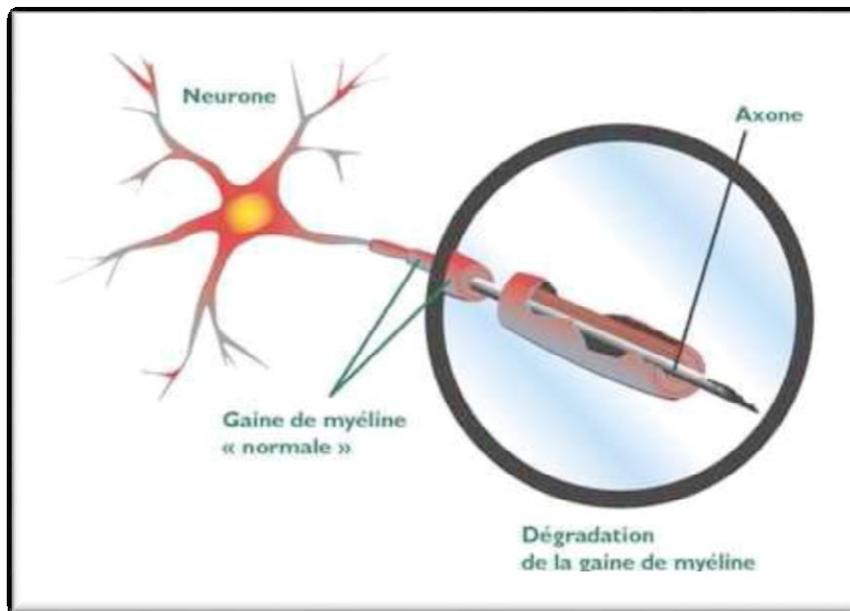


Figure 5 : Altération de la myéline dans le cas de la SEP [7].

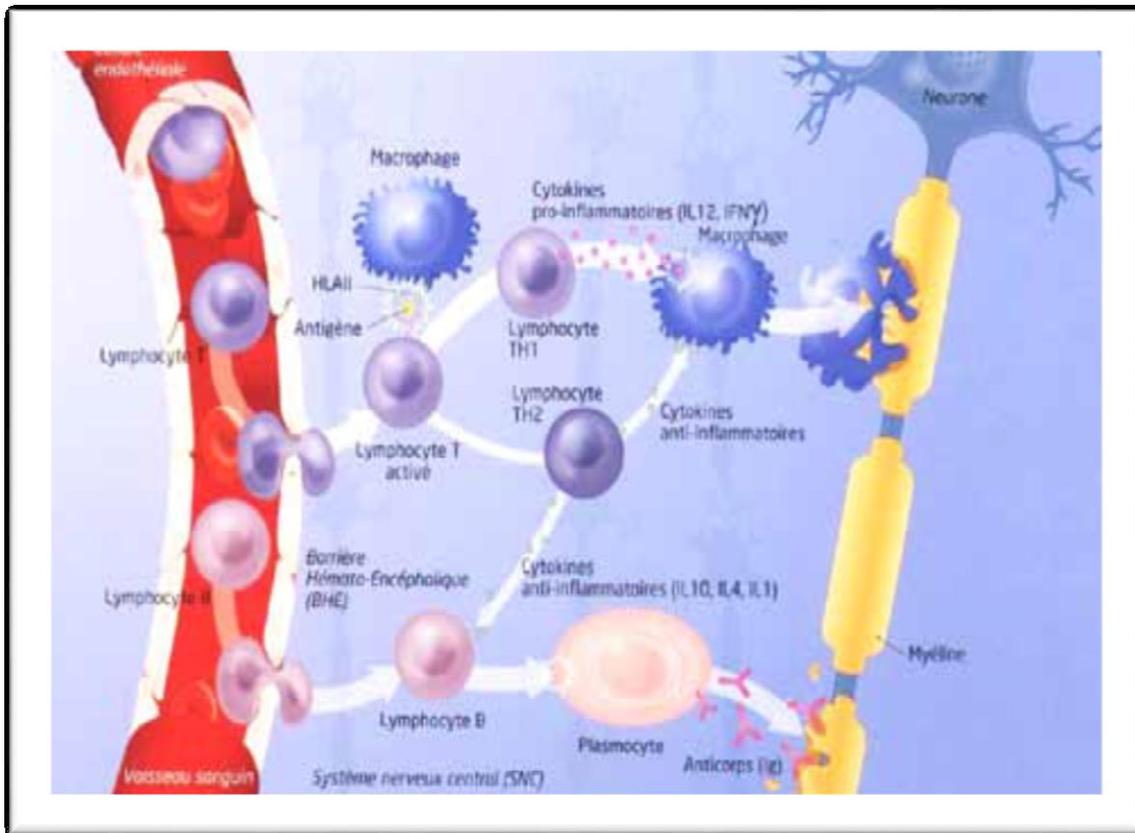


Figure 6 : Physiopathologie de la SEP [58].

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

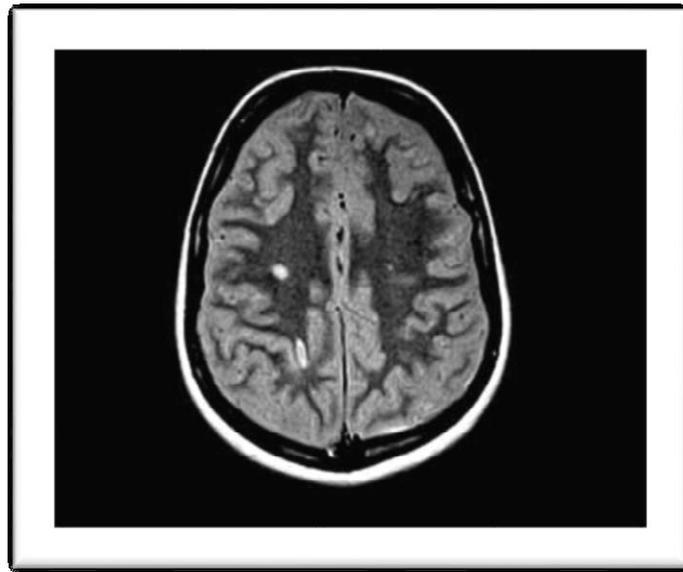


Figure 7 : Lésions de démyélinisation visibles à l'IRM [58].

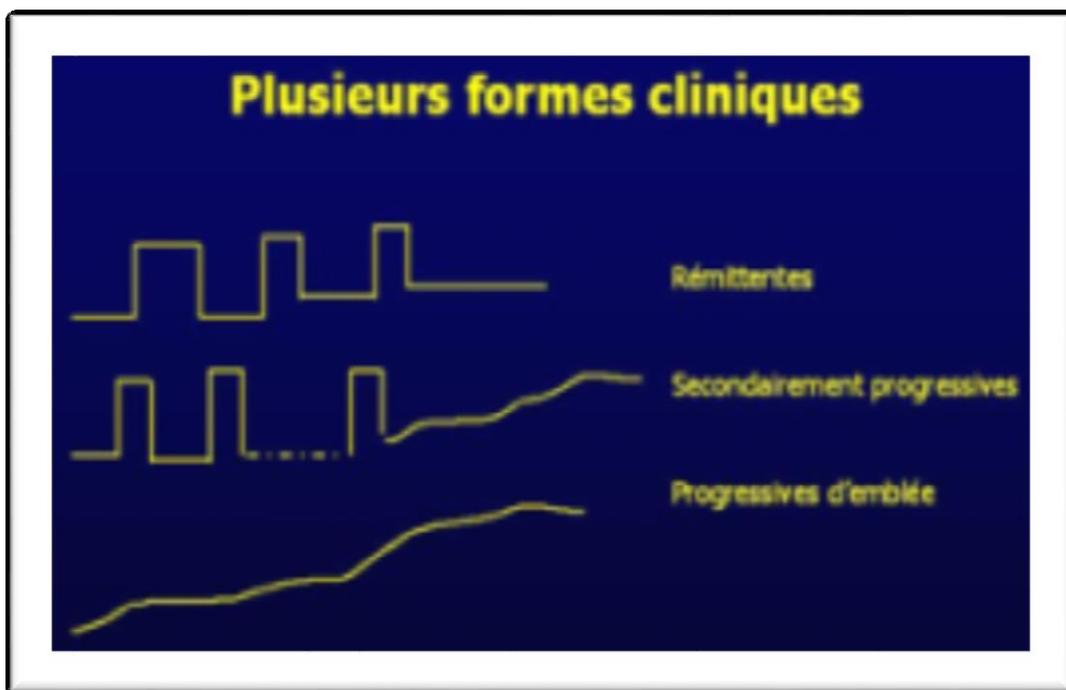


Figure 8 : Formes de la sclérose en plaques [62].

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

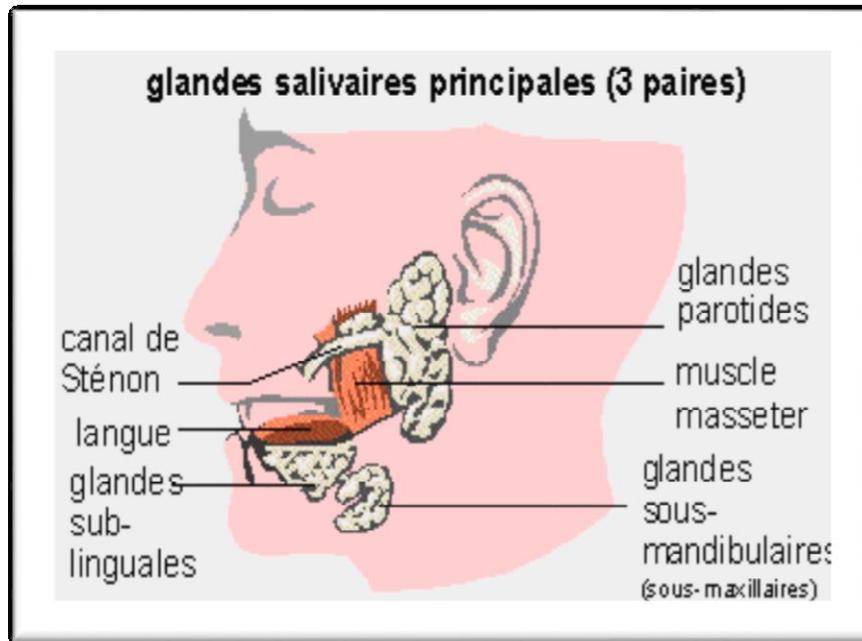


Figure 9 : localisation des trois paires de glandes salivaires [43].

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

	Plasma	Salive primaire	Salive finale (repos)	Salive finale (débit élevé)
Na⁺	145	160	1,5	50
Cl⁻	120	120	22	40
K⁺	4	15	25	20
HCO₃⁻	24		1	40

Tableau 1 : concentration ionique de la salive en mEq/L [43].

MATERIEL
ET
METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel biologique

1.1. Recrutement des patients

Trente patients provenant du service de neurologie du CHU de Constantine atteints de sclérose en plaques, déterminée par les symptômes cliniques et les tests de dépistage, ont été étudiés. Parmi les 30 patients recrutés, 24 femmes et 6 hommes ont été recensés. Les patients sélectionnés sont de différentes tranches d'âge (entre 15 et 47 ans) et dont la pathologie est au stade initial, modéré ou avancé. Les patients ne présentant pas une bonne hygiène buccale ont été exclus de l'étude.

Cette population a été comparée à des sujets sains (n=2) sans pathologie connue et possédant une bonne hygiène buccale.

1.2. Recueil de la salive

Pour le recueil de la salive nous avons adoptés la méthode décrite par Hirtz et al (2005). La salive totale est prélevée le matin, 2 heures après le petit déjeuner (environ 10 heures du matin) après que le patient se soit brossé les dents avec une brosse à dent dépourvu de dentifrice. Afin de favoriser la salivation, le patient doit boire un verre d'eau 15 minutes avant le prélèvement, et mâcher un petit bout de parafilm (environ 3 cm²), pendant quelques minutes. Trois ml de salive totale sont ainsi prélevés dans des tubes Falcon stériles. Les échantillons salivaires sont ensuite centrifugés à 10000 × g pendant 15 minutes afin de supprimer les mucines et les débris cellulaires et alimentaires encore présent dans la salive. Une fois prélevé, le surnageant est immédiatement congelé (-20°C).

1.3. Prélèvement sanguin

Cette étude vise à comparer les profils électrophorétiques du protéome sérique pour chaque patient. Pour cela, le sang est recueilli dans des tubes secs dans la même journée. Le sang est centrifugé à 3000 g pendant 10 min pour récupérer le sérum. Les sérums sont ensuite conservés à -20 °C jusqu'aux analyses.

2. Méthodes

2.1. Préparation des échantillons

Le sérum est dilué à 1/30^{ème} (v/v) et la salive est diluée à 1/2 (v/v) dans le tampon d'extraction composé de 12.5% Tris-HCl pH 6.8 (v/v), 24.1% eau distillée (v/v), 0.02% de bleu de

MATERIEL ET METHODES

bromophénol (p/v), SDS 0.1% et 20% de glycérol ; 2.5% (v/v) de β -mercaptoéthanol sont rajoutés au mélange pour réduire les protéines sérique et salivaires. Après agitation pendant 1 heure à température ambiante, les mélanges sont incubés à 65°C pendant 30 minutes puis centrifugés à 10000 t/min pendant 1 minute. Les surnageants contenant les protéines sériques et salivaires dissociées et réduites sont récupérés.

2.2. Electrophorèse verticale des protéines totales du sérum et de la salive par SDS-PAGE pH 8,8

Cette technique a été mise au point par LAEMMELI (1970) et modifiée par SINGH et al. (1991) en présence d'un détergent anionique : le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate).

Le support d'électrophorèse est formé de deux gels :

- Un gel de séparation (running gel) à $T^1 = 12,58\%$ et $C^2 = 0,97\%$.
- Un gel de concentration (stacking gel) à $T = 2,88 \%$ et $C = 1,42 \%$.

Ces deux gels sont préparés à base d'acrylamide à 40 % (p/v), de bis-acrylamide à 2% (p/v), du SDS à 10 % (p/v) et de Tris-HCl 1M, tamponnés à pH 8,8 pour le gel de séparation et à pH 6,8 pour le gel de concentration. Les deux gels sont polymérisés en présence du TEMED et de l'APS.

Une fine couche de butanol est ajoutée pour niveler le gel de séparation et le protéger de l'air, sa polymérisation s'effectue à la température ambiante (environ 45 minutes). Ensuite le gel de concentration est préparé, puis coulé, des peignes à 15 puits de 1,5 mm d'épaisseur sont immédiatement insérés. Après la polymérisation du gel de concentration (30 minutes), les peignes sont enlevés laissant ainsi des puits pour le dépôt des extraits protéiques, les puits sont remplis avec du tampon de migration avant de déposer les échantillons.

2.2.1. Tampon de migration

Le tampon de migration à pH 8,3 est constitué de glycine à 1,41% (p/v), de Tris à 0,3% (p/v) et de SDS à 0,1% (p/v) (pour plus de détails voir annexe N° 1).

2.2.2. Dépôt des échantillons

Le sérum et la salive sont déposés dans les puits avec des volumes respectifs de 20 μ l et 40 μ l.

2.2.3. Conditions de migration

Après le dépôt des échantillons, la cuve d'électrophorèse est remplie jusqu'à immersion avec le tampon de migration. Pour un gel de dimension 180x160x1.5 mm, une intensité constante de 40 mA est fixée et une tension ne dépassant pas 1200 V. Suite à l'échauffement du au courant électrique, la cuve est maintenue à une température de 10°C grâce à un système de refroidissement. La migration, dans ces conditions, est arrêtée après la sortie du front de migration (la migration dure environ 5 heures).

MATERIEL ET METHODES

2.2.4. Fixation, coloration et décoloration

Après migration, le gel de concentration est éliminé, le gel de séparation est démoulé et mis dans des bacs contenant :

- une solution de fixation composée de : TCA à 60%.
- une solution de coloration constituée de : bleu de Coomassie R250 à 1% (p/v)

Les bacs sont soumis en agitation douce (77 rpm) pendant 24 heures, les gels sont en suite décolorés en les plaçant dans l'eau de robinet pendant toute la nuit. Un scan est réalisé sur les gels ainsi préparés.

2.3. Lecture des électrophorégrammes

La lecture des diagrammes consiste à relever la mobilité de chacune des bandes présentes en mesurant la distance parcourue par chaque bande dans le gel de séparation. Afin de déterminer le poids moléculaire de chaque protéine, un marqueur de taille a été utilisé.

2.4. Analyse statistiques

Le traitement des données d'électrophorèse a fait appel à des méthodes statistiques. Les fréquences et les indices de similarités ont été effectués à l'aide d'Excel 2010. L'établissement des dendrogrammes est réalisé à l'aide du logiciel Statistica version 6.0.

RESULTATS

ET

DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Fractionnement des protéines et recherche de biomarqueurs

Pour le fractionnement des protéines salivaires et sérique, la technique d'électrophorèse utilisée est celle décrite par Laemmli (1970) et modifiée par Singh et al (1991). C'est une technique qui permet d'obtenir l'ensemble des protéines. La lecture des diagrammes nous permet de révéler la mobilité de chacune de ces bandes protéiques réparties dans les deux zones de protéines de haut poids moléculaire (HPM) et de faible poids moléculaire (FMP), en mesurant la distance parcourue par chaque protéine dans le gel de séparation.

1. Analyse des protéines fractionnées par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes et réductrices

1.1. Les protéines salivaires

Les diagrammes électrophorétiques des échantillons analysés renferment 48 bandes protéiques décelables qui se répartissent dans les deux zones des protéines salivaires avec des mobilités variant entre 3 à 170 mm.

Nous avons dénombré 48 bandes protéiques de mobilité différentes : 25 bandes protéiques dans la zone 1 des protéines salivaires HPM et 23 bandes protéiques dans la zone 2 des protéines salivaires FPM, caractérisées par des gammes de masses moléculaires approximatives de 50-250 KDa et de 10-50 KDa respectivement.

D'abord, la comparaison, entre les profils protéiques des témoins et des sujets malades, montre que certaines bandes protéiques présentent des variations quantitatives et/ou qualitatives.

A titre d'exemple la bande protéique B1 est fortement concentrée chez le témoin sain ainsi que les patientes (1, 2, 4, 17, 23, 36), elle est moins concentrée chez les patients (12, 18, 19, 20, 21) ainsi elle est faiblement concentrée chez certains patients et est présente sous forme de trace chez le patient 10. De plus cette protéine est présente chez les individus précédemment mentionnés, mais elle est absente chez les patients (8 et 35).

Cette protéine varie quantitativement et qualitativement, ce qui lui confère la propriété de biomarqueur quantitatif et qualitatif à la fois.

Un exemple de variation quantitative peut être illustré par les bandes protéiques B2 et B3 qui sont omniprésentes mais leur intensité varie d'un échantillon à un autre (figure 11), ces deux

RESULTATS ET DISCUSSION

bandes sont fortement concentrées chez les patients (9, 11 ; 24, 25) par rapport au témoin. Sur le plan clinique, le patient 9 est une femme âgée de 24 ans diagnostiquée depuis 1 mois d'une forme récurrente rémittente, et le patient 11 est une femme âgée de 47 ans diagnostiquée d'une forme récurrente rémittente ; alors que le patient 24 est une femme âgée de 45 ans diagnostiquée depuis 2010 et le patient 25 est une femme âgée de 30 ans diagnostiquée d'une forme récurrente rémittente.

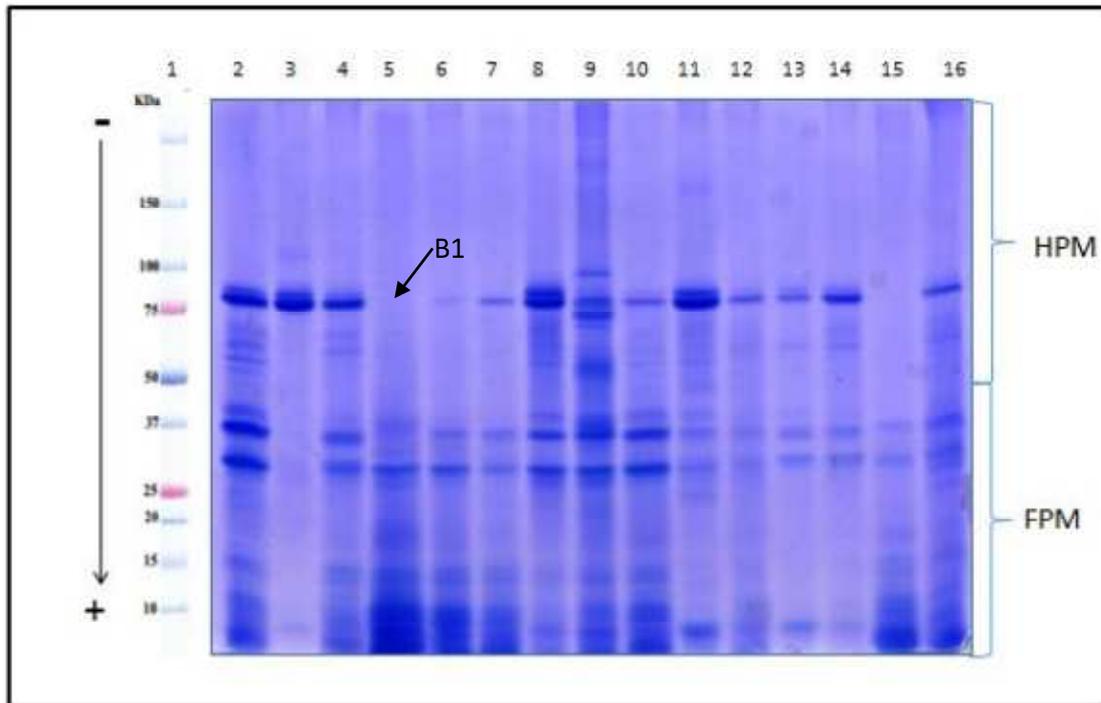


Figure 10: Fractionnement des protéines salivaires par SDS-PAGE pH 8.8 en conditions dénaturantes et réductrices. 1 : marqueur de taille, 11 : témoin sain, 2 à 10 et de 12 à 16 : des patients.

RESULTATS ET DISCUSSION

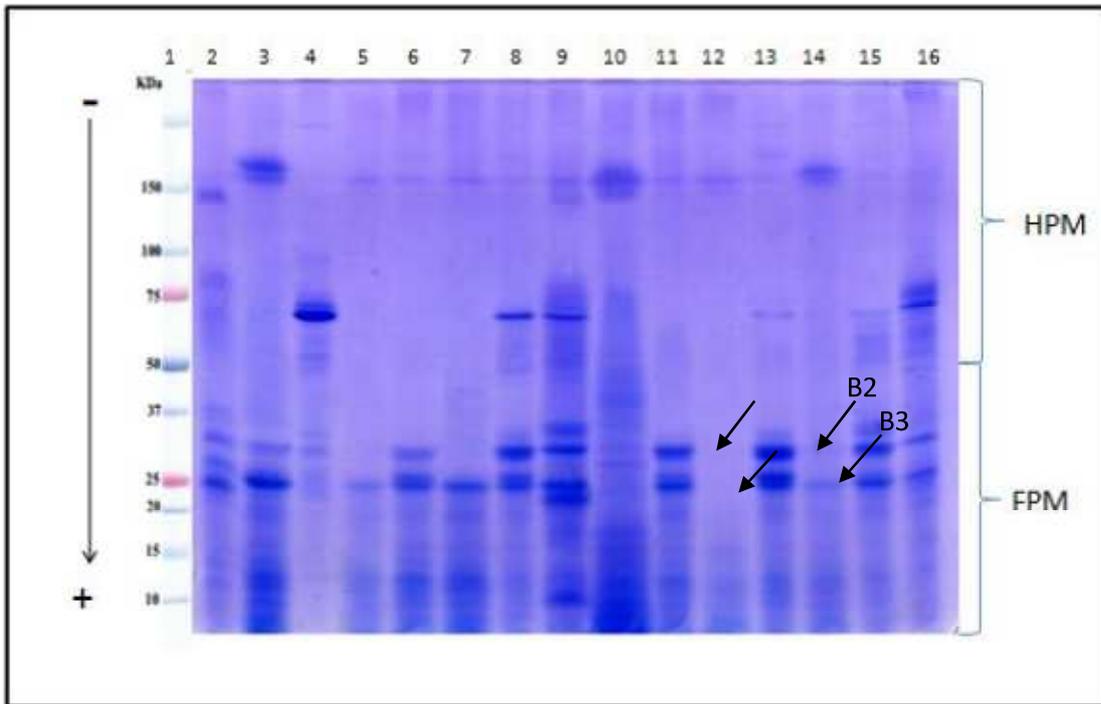


Figure 11: Fractionnement des protéines salivaires par SDS-PAGE pH 8.8 en conditions dénaturantes et réductrices. 1 : marqueur de taille, 2 : témoin sain, 3 à 16 : des patients

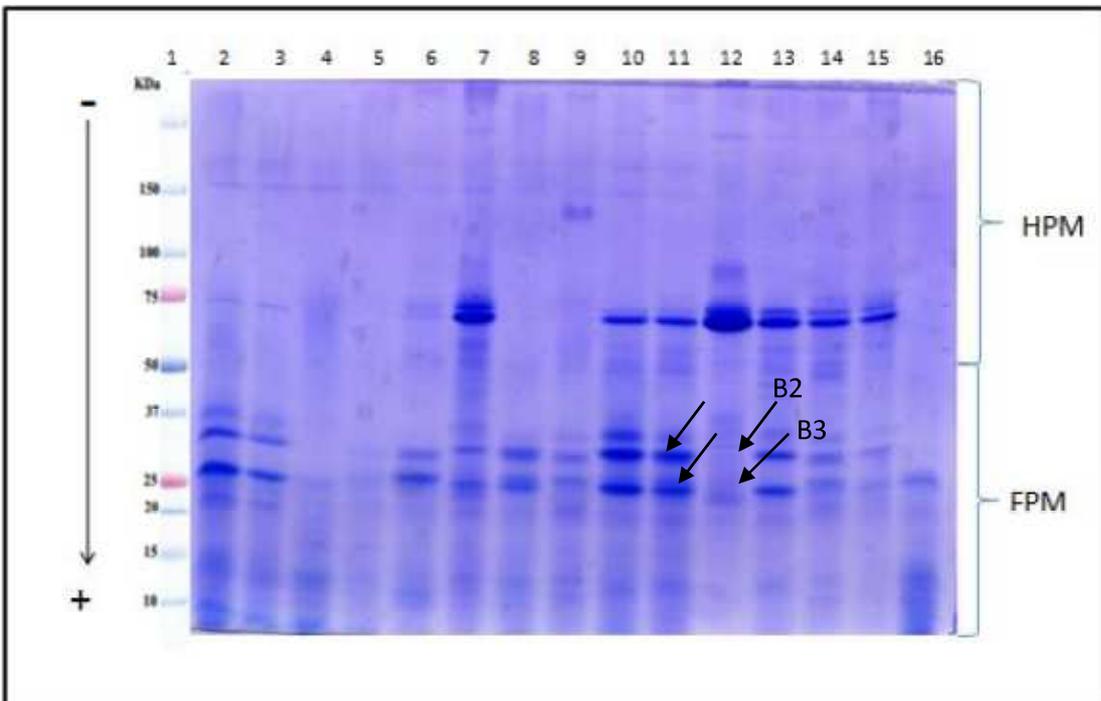


Figure 12: Fractionnement des protéines salivaires par SDS-PAGE pH 8.8 en conditions dénaturantes et réductrices. 1 : marqueur de taille, 9 : témoin sain ; 2 à 8 et 10 à 16 : des patients.

RESULTATS ET DISCUSSION

- **Etablissement des diagrammes types**

L'analyse des diagrammes électrophorétiques montre que ces derniers présentent de nettes différences en composition protéique à la fois qualitatives et quantitatives pour les différents patients. Un tel ensemble de résultats peut être alors exploité en estimant le degré de différence (ou d'analogie) entre les diagrammes des individus considérés deux à deux. Cette représentation nous permet donc de conserver une image réelle des gels pouvant servir comme base de données pour l'identification.

Nous rapportons dans le tableau 2 (Annexe 2) le diagramme type (la matrice binaire) pour les protéines salivaires des patients malades et des sujets sains (1 : Présence de la bande, 0 : Absence de la bande).

1.1.1. Etude de la variabilité des protéines salivaires dénaturées et réduites

a. Etude des protéines salivaires de HPM

L'analyse électrophorétique des 31 patients a permis de distinguer 25 types de protéines salivaires de haut poids moléculaires (tableau 3)

Tableau 03: Variabilité des protéines salivaires de HPM

RESULTATS ET DISCUSSION

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons (E)	Fréquences (%)
B1	3	T, E2, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E15, E16, E21, E22, E25, E26, E27, E28, E29, E36	67,74
B2	5	T, E1, E4, E10, E35	16,12
B3	6	E8, E18	6,45
B4	15	T, E2, E6, E7, E11, E12, E15, E16, E18, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29	54,83
B5	23	E18, E19	6,45
B6	26	E4, E5, E9, E11, E18	16,12
B7	27	T, E3, E4, E5, E6, E7, E9, E11, E15, E16, E18, E24, E25, E27	45,16
B8	29	T, E1, E12, E17, E18, E19, E20, E21, E22, E23, E24, E25, E27	41,93
B9	31	T, E1, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E15, E16, E18	48,38
B10	35	T, E7, E16, E17, E18, E19, E20, E21, E22, E23, E24, E25, E27, E28, E29, E30	51,61
B11	38	E18	3,22
B12	42	T, E18	6,45
B13	47	T, E2, E8	9,67
B14	55	E8, E18, E22, E26	12,90
B15	57	E8	3,22
B16	58	T	3,22
B17	60	E25, E26, E27, E28, E29	16,12
B18	62	T, E1, E2, E4, E7, E16, E17, E18, E19, E21, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29, E36	61,29
B19	63	T, E1, E2, E4, E6, E7, E10, E11, E12, E15, E16, E17, E18, E19, E20, E21, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29, E36	80,64
B20	69	E18, E25, E27, E28	12,90
B21	72	T, E1, E2, E4, E15, E16, E17, E18, E22, E24, E25, E27, E28, E29	45,16
B22	78	T, E1, E2, E4, E15, E16, E21, E22, E24, E25, E26, E28, E29, E36	45,16
B23	82	T, E1, E2, E6, E7, E8, E16, E17, E18, E19, E21, E22, E23, E24, E25, E27, E28, E29	58,06
B24	86	T, E1, E17, E18, E19, E20	19,35
B25	92	T, E1, E5, E8, E19, E20, E21, E24, E26, E27, E28, E29	38,70

RESULTATS ET DISCUSSION

D'après le tableau ci-dessus, on distingue un grand polymorphisme des protéines salivaires de HPM, qui se situe au niveau de la bande protéique 19 dont la mobilité est de 63 mm, qui est la plus fréquente avec une fréquence maximale de 80.64%, ce qui implique sa dominance dans la zone 1. Suivie des bandes protéiques B1 et B18, dont les mobilités sont respectivement : 3 mm et 62 mm qui sont moins fréquentes que la précédente, avec des pourcentages de 67.74% et de 61.29%. Ensuite, on retrouve les bandes protéiques B11, B15 et B16 dont les mobilités sont respectivement 38 mm, 57 mm, 58 mm et les bandes B3, B5 et B12 avec des mobilités 6 mm, 23 mm, 42 mm respectivement, qui sont très faiblement fréquentes avec un pourcentage minimal de 3.22% et de 6.45%. Un cas particulier de la bande monomorphe B15 doit être signalé à cause de sa présence unique chez le patient 6, cliniquement, c'est une patiente âgée de 29 ans diagnostiquée depuis trois mois d'une forme récurrente rémittente.

Enfin on retrouve la bande protéique B16 dont la mobilité est de 58 mm qui se trouve uniquement chez le témoin sain, cela peut être interprété par les fluctuations d'expression des protéines salivaires chez les patients.

b. Etude des protéines salivaires de FPM

L'étude de la variabilité des protéines salivaires de la population d'étude révèle la présence de 23 protéines salivaires de faibles poids moléculaire et de mobilités différentes localisées dans la zone 2 (tableau 4)

Tableau 04: Variabilité des protéines salivaires de FPM

RESULTATS ET DISCUSSION

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons (E)	Fréquences (%)
B26	93	T, E5, E24, E30, E28, E29	19,35
B27	95	T, E2, E6, E7, E8, E11, E15	22,58
B28	97	E7, E15	6,45
B29	98	E2, E6, E11, E15, E24, E26, E28	22,58
B30	101	E2, E6, E11, E15, E24, E26, E28	22,58
B31	103	T, E1, E4, E6, E9, E11, E15	22,58
B32	105	E28	3,22
B33	110	T, E1, E4, E8, E10, E12, E17, E18, E20, E21, E22, E23, E24, E25, E27, E28, E29, E35, E36	61,29
B34	114	E4, E6, E8, E9, E10, E11, E15, E23, E28	29,03
B35	116	T, E21, E23, E24, E25, E28, E30	22,58
B36	117	T, E1, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E15, E16, E17, E18, E19, E20, E21, E22, E23, E24, E25, E27, E28, E29, E30, E35, E36	93,54
B37	121	E1, E7, E8, E10, E12, E15, E16, E36	25,80
B38	123	T, E1, E3, E4, E5, E6, E9, E11, E12, E15, E16, E17, E18, E21, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29, E30, E36	77,41
B39	130	E1, E18	6,45
B40	137	T, E7, E8, E16, E19, E20, E21, E23, E24, E25, E35, E36	38,70
B41	139	T, E1, E4, E5, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E16	35,48
B42	142	T, E1, E4, E5, E7, E8, E9, E11, E12, E17, E18, E19, E21, E22, E23, E24, E25, E27, E28, E30	64,51
B43	146	T, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E15, E16, E19, E21, E28, E35, E36	64,51
B44	151	E1, E4, E8, E10, E12, E15, E16, E17, E35, E36	32,25
B45	159	T, E1, E4, E5, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E15, E17, E18, E19, E20, E24, E25, E30, E35, E36	51,61
B46	160	E1, E4, E8, E10, E12, E18, E19, E35, E36	29,03
B47	165	T, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E15, E16, E17, E18, E19, E20, E21, E23, E35, E36	74,19
B48	170	T, E1, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E15, E16, E17, E18, E19, E20, E35, E36	64,51

RESULTATS ET DISCUSSION

D'après le tableau ci-dessus, on remarque des fluctuations des protéines salivaires de faible poids moléculaire, ces variations apparaissent au niveau de la bande protéique B 36 dont la mobilité est de 117 mm. Elle reste la plus fréquente avec un taux de 93.54% ce qui montre sa dominance dans la zone 2. Puis, on retrouve la bande protéique B 47, dont la mobilité est de 165 mm qui est moins fréquente que la précédente avec un taux de 74.19%. Enfin, la plus faible fréquence se situe au niveau de la bande protéique B 32 dont la mobilité est de 105mm, qui se trouve avec un taux de 3.22%.

1.1.2. Classification hiérarchique ascendante des patients

La classification hiérarchique ascendante consiste à classer des individus ayant un comportement similaire sur un ensemble de variables. Donc créer à chaque étape une partition obtenue en agrégeant 2 à 2 les éléments les plus proches. Les regroupements effectués à chaque pas de l'algorithme de classification hiérarchique rassemblent des éléments qui sont plus ou moins proche entre eux. Plus on avance dans le regroupement (plus on se rapproche du sommet de l'arbre), plus le nombre de points déjà agrégés est important et plus la distance minimale entre les classes qu'il reste à agréger est importante, on peut associer à chacun des nœuds de l'arbre cette « plus petite distance ».

Cette représentation matérialise bien le fait que les classes formées au cours du processus de classification constituent une hiérarchie indiquée de classe partiellement emboîtées les unes dans les autres. Le dendrogramme (représentation sous forme d'arbre phylogénétique) est réalisé à partir des comparaisons de la composition protéique des différents patients.

- **Dendrogramme des protéines salivaires dénaturées et réduites**

Le dendrogramme obtenu à partir des distances d'agrégation nous montre de nombreux groupes permettant d'estimer la ressemblance dans la composition protéique des échantillons (Figure 13).

RESULTATS ET DISCUSSION

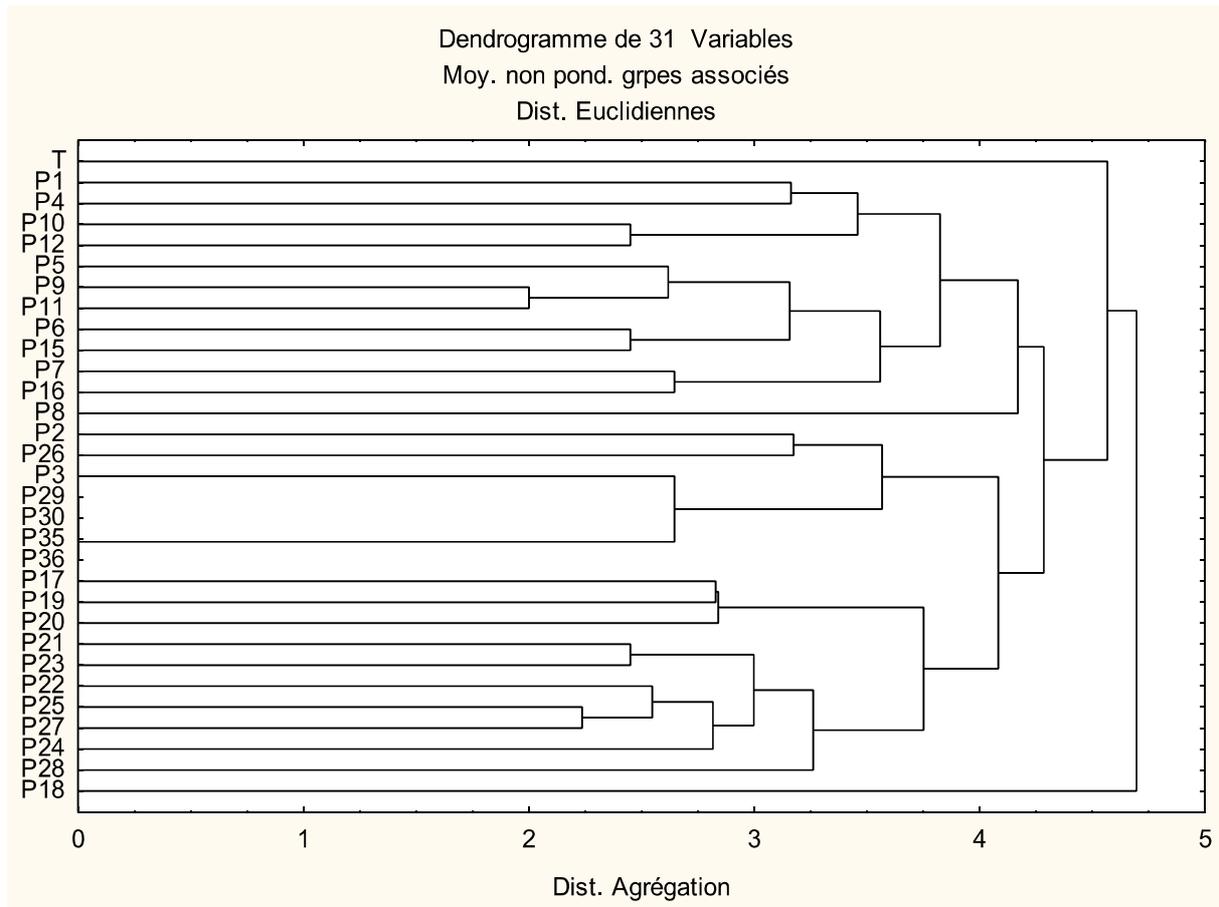


Figure 13: Dendrogramme des 31 patients révélés dans les conditions dénaturantes et réductrices

Le dendrogramme obtenu à partir des distances d'agrégations révèle de nombreux groupes (figure 13). A la distance d'agrégation 4.75, la population d'étude est divisé en deux groupes, dont le patient 18 constitue un groupe à part, traduisant son profil protéique typique différent de toute la population d'étude, il s'agit d'une patiente âgée de 39 ans, diagnostiquée depuis 23 ans (depuis 1992), c'est la patiente la plus anciennement diagnostiquée au sein de la population d'étude, son profil typique peut-être expliqué par l'ancienneté de la maladie. Le deuxième groupe comprend le reste de la population.

A la distance d'agrégation 4.5, l'ensemble des échantillons est divisé en deux groupes. Le premier groupe contient uniquement le témoin, tandis que le second groupe comprend le reste des patients et est divisé à son tour en deux sous-groupes. Chaque sous-groupe est divisé en deux autres sous-groupes.

L'état physiologique et pathologique des témoins et des patients, et les résultats des analyses en cluster de la composition en protéines salivaires ne sont pas corrélés malgré les différences

RESULTATS ET DISCUSSION

qui existent entre les différents patients recrutés d'une part, et les différences qui existent entre les patients et le témoin d'autre part. A titre d'exemple : à la distance d'agrégation 2, les deux patients (9 et 11) appartiennent au même groupe et forme un clade malgré la divergence qui existe entre eux, en effet, le patient 9 est une femme âgée de 47 ans, SEP de forme rémittente récurrente alors que le patient 11, est une femme âgée de 24 ans avec une SEP récente (diagnostiquée depuis un mois seulement).

A la distance d'agrégation 2.5, un autre exemple concerne les patients 22 et 27 qui forment un clade malgré les différences qui existent entre eux, le patient 22 est un enfant âgé de 14 ans avec une SEP récente alors que le patient 27 s'agit d'une femme âgée de 47 ans SEP de forme rémittente récurrente (diagnostiqué depuis 2008).

A la distance d'agrégation 2 et 2.5 respectivement, les deux patients (9 et 21) se trouvent dans deux groupes différents malgré leur état clinique commun, en effet les deux sont des femmes âgées de 47 ans avec une SEP de forme rémittente récurrente.

1.1.3. Indice de similarité des diagrammes protéiques salivaire

L'indice de similarité ou indice de ressemblance (IRS) a été calculé en rapportant l'indice de similarité absolu (IAS) au nombre total (N) des bandes présentes dans l'un, au moins, des diagrammes des échantillons comparés. L'IAS présente l'ensemble des bandes qui ne sont pas significativement différentes d'une autre c'est-à-dire qu'ils ont la même mobilité.

$$\text{IRS} = \text{IAS} / \text{N} \times 100$$

Les valeurs de l'IRS sont rassemblées dans le tableau 5 :

RESULTATS ET DISCUSSION

Les valeurs faibles signifient que les diagrammes présentent de nombreuses dissemblances et inversement, lorsque les diagrammes apparaissent très voisins. La plupart des échantillons restent différenciable car leurs diagrammes présentent au moins une différence significative.

Les indices de similarités ont été calculés pour les 31 patients (un témoin et 30 ayant la Sclérose en plaques). Ils sont représentés sous forme de matrice dans le tableau 5. Cette matrice fournit les valeurs d'IRS trouvées entre les diagrammes protéiques comparés deux à deux. Il en ressort que l'indice se situe entre 0% et 87%.

Une valeur est faible lorsqu'elle varie entre 0 et 50%, et une valeur est considérée élevée lorsqu'elle est comprise entre 52% et 87%.

La matrice présente 381 IRS inférieurs à 50% dont deux sont nulles (0%) et 70 IRS supérieurs à 51%.

Les patients présentant 0% de similarité ont des profils protéiques entièrement différents tels que : les patients 2 avec 30, cliniquement ; le patient 2 est un homme âgé de 42 ans, diagnostiqué depuis 15 ans d'une forme récurrente rémittente, alors que le patient 30 est une femme, diabétique âgée de 39 ans, cela peut être expliqué par l'influence de la maladie associée, en outre les patients 26 et 35 aussi présentent une dissemblance totale. En revanche les patients présentant 87% de similarité ont des profils protéiques semblables tels que les patients 26 avec 30 (26 : est une femme âgée de 44 ans ; 30 : est une femme diabétique âgée de 39 ans).

L'observation de ce tableau indique aussi des valeurs d'IRS importantes qui varient entre les différents patients dans l'intervalle de 70% à 86%. A titre d'exemple :

- IRS à 70% entre les patients 11 et 15, 7 et 16.
- IRS à 71% entre les patients 5 et 9.
- IRS à 72% entre les patients 15 et 6.
- IRS à 74% entre les patients 24 et 25.
- IRS à 75% entre les patients 11 et 6, 35 et 36.
- IRS à 76% entre les patients 25 et 26.
- IRS à 79% entre les patients 11 et 9.
- IRS à 86% entre les patients 12 et 10.

RESULTATS ET DISCUSSION

Ainsi ces différents patients présentent des diagrammes voisins avec autant de ressemblances que de dissemblances, ce qui fait penser que la composition protéique est presque la même.

Tous cela, signifie que l'expression des protéines salivaires est assez dissemblable chez la majorité des patients étudiés.

A la lumière de tous ces résultats, nous concluons qu'il existe une similitude importante entre certains patients présentant naturellement une ressemblance dans leur composition protéique et /ou leur état physiologique ou pathologique.

A l'inverse d'autres patients ayant une origine physiologique ou pathologiques éloigné et une différence dans leur composition protéiques montrent des IRS faibles.

1.2. Les protéines sériques

Le résultat de fractionnement des protéines sériques, montre peu de différences (polymorphisme) entre les profils sériques des patients contrairement aux protéines salivaires qui présentaient un polymorphisme très important. Pour cela, l'analyse adoptée pour les protéines sériques a été basée sur les différences détectées.

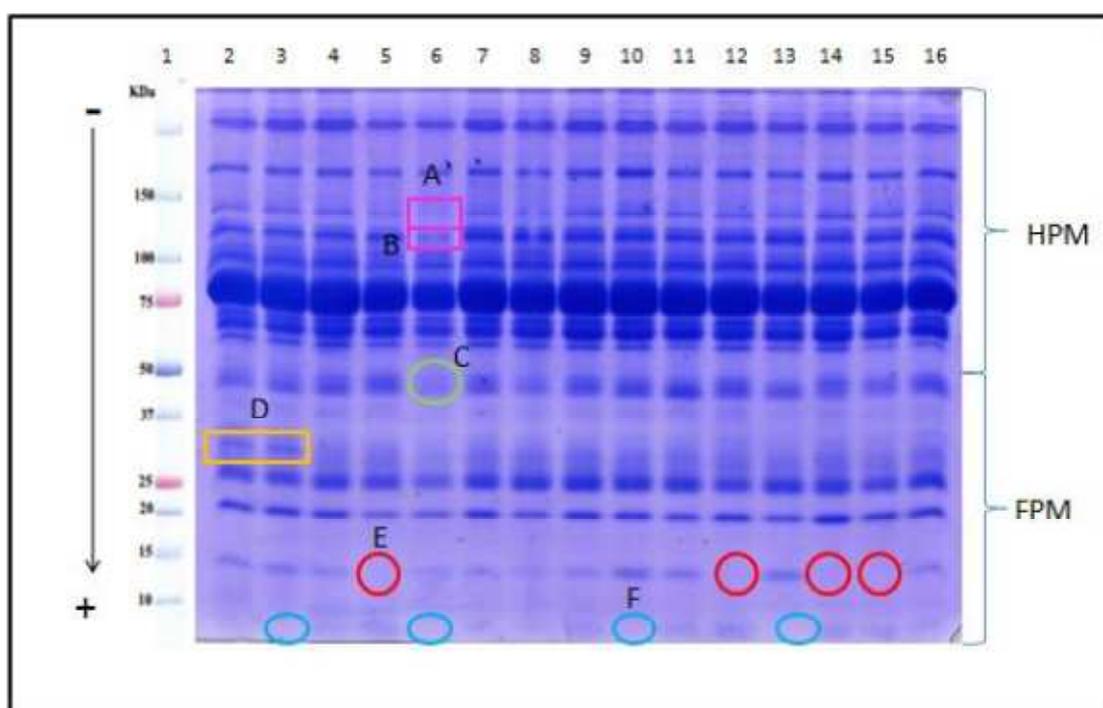


Figure 14: Fractionnement des protéines totales du sérum par SDS-PAGE pH 8,8 en condition dénaturante et réductrice. Patients (2,3 et de 5 à 16). Témoin (4)

La comparaison des profils électrophorétique des malades et des sujets sains révèle quelques variations dans la composition protéiques dans les deux zones des protéines salivaires HPM et FPM. Six bandes protéiques nommées A, B, C, D, E et F sont les plus variables

RESULTATS ET DISCUSSION

qualitativement et quantitativement. La variation de ces dernières est représentée dans le tableau 6.

Tableau 06: variation des bandes protéiques A, B, C, D, E et F

	A/Intensité	B/Intensité	C/Intensité	D/Intensité	E/Intensité	F/Intensité
Témoin	+++	+++	++	-	++	+
E2	+++	+++	++	++	++	+
E3	+++	+++	++	++	++	-
E5	++	+++	++	-	-	+
E6	+	+	+	-	+	-
E7	++	+++	++	-	+	+
E8	++	+++	++	-	+	+
E10	+++	+++	++	-	++	-
E12	+++	+++	++	-	-	+
E13	++	+++	++	-	++	-
E14	+++	+++	++	-	-	+
E15	+++	+++	++	-	-	+

Les variations entre les sujets sains et malades résident principalement dans la zone de FPM, quelques variations dans la zone de HPM sont aussi révélées.

D'abord dans la zone de HPM : les deux bandes protéiques A (de PM 140 KDa) et B (125 KDa) présentent des variations quantitatives, dont la concentration la plus élevée est observée chez le témoin et la majorité des patients, un cas particulier est celui du patient 6 qui présente la concentration la plus faible pour les deux bandes protéiques, sur le plan clinique le patient 6 s'agit d'une femme âgée de 39 ans diagnostiquée depuis 9 ans de la forme récurrente rémittente.

En comparaison avec une étude précédente, la zone qui regroupe ces deux bandes protéique, représente la zone des IgG, donc ces deux bandes protéiques appartiennent à la famille des IgG.

Dans la zone de FPM, les bandes protéiques C, D, E, F avec des PM respectifs de 45, 30, 14 et 5 KDa, présentent des variations quantitatives et qualitatives dont la bande la plus

RESULTATS ET DISCUSSION

marquante était la bande D, cette dernière était absente chez le témoin et tous les patients sauf le patient 5, cliniquement le patient 5 est un homme âgé de 33 ans diagnostiqué d'une forme évolutive.

La bande E est la plus variable quantitativement et qualitativement or, elle est présente chez le témoin et plus ou moins variable chez la majorité des patients, et absente chez les patients : 14, 24, 26 et 28, cliniquement, tous ces patients sont de la même tranche d'âge (37 à 47 ans) diagnostiqués depuis au moins 7 ans d'une forme récurrente rémittente. De même, la bande F variable qualitativement et quantitativement est absente chez le témoin et les patients 21 et 25 âgés entre 29 et 33 ans qui sont nouvellement diagnostiqués d'une forme évolutive.

Ces deux bandes protéiques (D et E) peuvent être des marqueurs négatifs dans l'évolution de la maladie.

CONCLUSION

CONCLUSION

L'objectif de ce travail consiste à investiguer et explorer le protéome salivaire des patients atteints de sclérose en plaque avec ses différentes formes évolutives et de le comparer au protéome sérique par application des technique d'électrophorèse monodimensionnelle 'SDS-PAGE'.

En amant de ce travail, notre première préoccupation était d'obtenir la meilleure expression possible des protéines salivaires et sérique humaines par la mise au point d'une méthode d'extraction pour une séparation optimale des protéines des deux liquides biologiques (sérum et salive), cela nous a conduit à adopter la méthode de Laemmli (1970) et modifiée par Singh et al. (1991) avec des dilutions précises, par la suite, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à pH alcalin (PAGE 8.8) dans les conditions dénaturantes et réductrices a été faite.

Par conséquent, cette méthode nous a permis l'obtention des profils protéiques nettement séparés et reproductibles pour les deux liquides biologiques où 48 bandes protéiques salivaires de mobilité et d'intensité différente ont été détectées, 25 bandes protéiques de HPM et 23 bandes protéiques de FPM et nous a permis de :

- Comparer les profils électrophorétiques des sujets malades avec ceux des témoins et de remarquer que chacun des échantillons possède un profil protéique qui lui est propre et qui peut ressembler ou pas à celui d'un autre échantillon ou celui du témoin par l'absence ou la présence d'une ou plusieurs protéines.
- Révéler les mobilités de chacune des bandes protéiques de haut et de faible poids moléculaire.
- Dénombrer des bandes protéiques communes entre les différents échantillons.
- Enfin de distinguer les différences dans la composition protéiques des patients malades et des témoins.
- Identifier quelques protéines susceptibles d'être des biomarqueurs salivaires de la maladie.

Les profils électrophorétiques sériques de tous les patients et le témoin sont très rapprochés voir similaires sauf quelques bandes protéiques variables quantitativement et qualitativement (A, B, C, D, E et F).

En outre, l'analyse statistique effectuée en calculant les fréquences, l'indice de similarité, également en établissant des diagrammes types et une classification hiérarchique a permis d'apprécier numériquement la diversité des protéines salivaires.

CONCLUSION

En perspectives, nous envisageons à améliorer l'étude sur les protéines salivaires par l'utilisation des techniques avec une meilleure résolution telle que l'électrophorèse bidimensionnelle, ensuite la spectrométrie de masse afin d'identifier les biomarqueurs d'intérêt.

REFERENCES

REFERENCES

1. Acuna G.S., Franco Garrocho L.E., Alonso S.T et Uribe L.K. 2011. Parotid gland gigant pleomorphic adenoma: report of case and literature revision. *Revista oral*, 12 (36) : 679-682.
2. Aren G. 2003. Periodontal health, salivary status and metabolic control in children with type 1 diabetes mellitus. *J Periodontol*, 74 (12): 1789-1795.
3. Azerdo S et Lajaunias S. 2011. Les biomarqueurs ouvrent de nouvelles perspectives de diagnostic. *Agefi Magazine/Biotech*, 20 (20): 1-3.
4. Barnett M.H. 2003. Progressive increase in incidence and prevalence of multiple sclerosis in Newcastle: a 35-year study. *Journal of the Neurological Sciences*, 213: 1-6.
5. Behin A et Pradat P.F. 2002. *Neurologie*. Australia, P 61-62.
6. Bertrand A et Epelbaum S. 2009. Sclérose en plaques. *In: Neurologie*. 2ème éd. Edition Masson. Cedex. p 85-101.
7. Blin C. 2011. *Traitement de la sclérose en plaques par le Natalizumab: bilan d'utilisation et évaluation de la qualité de vie au CHU de Nancy*. Thèse de doctorat. Pharmacie. Université d'Henri Poincaré. Nancy 1. p 104.
8. Bommas T. 2008. Système nerveux central. *In : Cours d'anatomie*. 2ème éd. Edition De Boek Université. Paris. p 363-437.
9. Bouchenak K.D. 10000 malades recensés en Algérie. Sclérose en plaque. *Le Midi Libre*. 01.12.14
10. Brassat D. 2010. Physiopathologie de la sclérose en plaques. *Presse Med*, 39: 341-48.
11. Bruder N., Ravussin P et Bissonette B. 2007. La réanimation neurochirurgicale. Edition Springer. France. p 504.
12. Caudie C., Birouk A., Bancel J., Claudy D., Gignoux L., Vukusic S et Confavreux C. 2005. Le profil cytoimmunologique du LCR lors du diagnostic précoce de la sclérose en plaques. *Pathologie Biologie*, 53 : 68-74.
13. Correale J., Farez M et Razzitte G. 2008. Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells. *Ann Neurol*, 64:187-99.

REFERENCES

14. Couturier N. 2009. Génétique et épi génétique de la sclérose en plaques : susceptibilité et réponse au traitement. Thèse de doctorat. Immunologie. Université de Toulouse III. p 224.
15. Delaroche O., Evreux B., Bigot C.E., Wiertlewsky S., Bailly F., Loubersac V et Orsonneau J.L. 2003. Étude biochimique du liquide céphalorachidien dans le cadre de la sclérose en plaques. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 18 : 86-91.
16. Ebers G.C. 2008. Facteurs environnementaux de la sclérose en plaques. *Lancet Neurol*, 7: 268-77.
17. Fraser G.A, MEYER R.M. 2007. Biomarkers and the design of clinical trials in cancer. *Biomark*. p 97-99.
18. Ganong W. 2005. Les glandes salivaires et la salive. Physiologie médicale. De Boeck. p 464-465.
19. Georges D. 2012. Pathologie générale et salive. Thèse de diplôme d'état de docteur en chirurgie dentaire. Nancy : Université Henri Poincar-Nancyl. p 256.
20. Gillaina N., Fumal A et Minon J.M. 2006. Bandes oligoclonales et index IgG interprété selon Reiber dans les maladies inflammatoires du système nerveux central. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 21: 348–356.
21. Guenard H. 2001. Physiologie humaine. Contrôle de la sécrétion salivaire. Wolters kluwer . p 409.
22. Hawkes C.H. 2007. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a metanalysis. *Mult Scler*, 13: 610-5.
23. Helardot D., Berl M, Rebillon M et Roussely B. 2006. Fonction neurologique. *In : Guide infirmier(e) anesthésiste*. 3ème éd. Edition Masson. Paris. p 32-50.
24. Henri M. 2008. Neurologie. De Baeck. France. p 148-149.
25. Jerom C. 2007. Etude expérimentale du test salivaire cario analysé sur des patients subissant une radiothérapie de la shere ORO faciale. Thèse de docteur en chirurgie dentaire. Metz : Universite Henri Poincar-Nancyl. p 117.
26. Kebir H. 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature Médecine*, 13:1173-75.
27. Kierszenbaum A.L. 2006. Histologie et biologie cellulaire : Une introduction à l'anatomie pathologie. Aspect histologiques des différents types de glandes salivaires principales. De Boack. p 451-453.

REFERENCES

28. Kuhle J., Mehling M et Regeniter A. 2007. Diagnostic moderne du liquide céphalorachidien. *Forum Med Suisse*. 7:166–174.
29. Lacombe M. 2007. Le système nerveux. *In* : le Lacombe précis d'anatomie et de physiologie humaines. tome 1. 29ème éd. Edition Lamarre. France. p 40-58.
30. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680- 685.
31. Lagadic L., Aquet T.C., Miard J.C et Amade F.R. 1997. Biomarqueurs en Ecotoxicologie. Aspects fondamentaux, Paris. P 122.
32. Le Gal M. 2010. Comprendre Une Situation Clinique Par l'anatomie-Physiologie. ESTEM. Paris : De Boeck diffusion. p 275-276.
33. Mehling M et Kappos L. 2009. Traitement de la sclérose en plaques 2^{ème} partie : Les nouvelles perspectives thérapeutiques1. *Forum Med Suisse*, 38 : 669-73.
34. Michael M., Jeremy N., Thompson H. 2004. Chirurgie Clinique. Boeck Université. Bruxelles. p 671.
35. Michael S., Gazzaniga., Richard B., Ivry., George R et Mangun. 2001. Neurosciences cognitives.1^{ère} édition: De Boeck & Larcier. Paris. p 24
36. Milka G. 2013. Therapeutiques endovasculaires des pathologies veineuses : Edition Springer-Verlag. Paris. p 130
37. Neau J.P., Artaud-Uriot M.S., Lhomme V., Bounaud J.Y., Lebras F., Boissonnot L., Moinot N., Ciron J., Larrieu D., Mathis S., Godeneche G et Ingrand P. 2011. Vitamine D et sclérose en plaques : Etude prospective d'une cohorte de patients de la région Poitou-Charentes. *Revue neurologique*, 167 : 317-323.
38. Oguievetskaia K., Cifuentes D.C., Girault J.A et Goutebroze L. 2005. Contacts cellulaires des fibres myélinisées du système nerveux périphérique. *Médecine sciences*, 21 : 162-169.
39. Parham P. 2003. Le système immunitaire. France
40. Poirier J. 2011. *Le système nerveux, central et périphérique : formation, fonction et rôle*. 1^{ère} édition. Edition Arsep fondation. Paris. p 20.
41. Prennes M., Ollivier C et Lorillon P. 2008. La sclérose en plaques, première cause non traumatique de handicap sévère acquis. *Actualités pharmaceutiques hospitalières*.13 :14 16.
42. Purves D., George J.A., Fitzpatrick W. C., Hall., LaMantia A.S., James O et McNamara. 2005. Neurosciences. 3^{ème} édition. Bruxelles.

REFERENCES

43. QA international collectif. 2009. Le visuel du corps humain. Morphologie homme femme. Québec Amérique. P19.
44. Rohkamm R. 2005. *Atlas de poche de neurologie*. 2^{ème} éd. Edition Médecine-sciences Flammarion. Paris. p 438.
45. Romanetto J. 2011. Intérêts des marqueurs biologiques dans les essais cliniques. Thèse de docteur en pharmacie. Nancy : Université de Nancy, 121p. http://www.scd.uhp-nancy.fr/docnum/SCDPHA_T_2011_ROMANETTO_JULIEN.pdf
46. Jouveshomme S et all. Internat-Nouveau programme. Neurologie.
47. Serge F., Guerbet S., Padee N., Slama K. 2010. Annales BP du préparateur en pharmacie. France. P 46.
48. Silverthorn D.U. 2007. Neurones et réseaux de neurones. *In : Physiologie humaine*. 4^{ème} édition. Edition Pearson. Paris. p 936.
49. Singh N.K., Shepherd K.W et Cornish G.B. 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *J.Cereal. Sci*, 14:203-208.
50. Stankoff B. 2002. Sclérose en plaques et autres maladies de la substance blanche du système nerveux central. *In : Behin A et Pradat P.F. Neurologie. Edition doin*. Paris. p 61-73.
51. Stevens A et Lowe J. Anatomie Pathologique Générale et spéciale. P 414.
52. Sy Hung N et Bourouina R. 2008. Manuel d'anatomie et de physiologie : édition Lamarre : Wolters Kluwer. France. P 136.
53. Tourbah A. 2003. *La sclérose en plaques : aujourd'hui et demain*. Edition John Libbey Eurotext. Paris. p 56.
54. Tritsch D., Dominique C.M., Feltz A. 1999. Physiologie du neurone. France. P66.
55. Vollmer T. 2007. The natural history of relapses in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 256, S5-S13.
56. Vukusic S et Confavreux C. 2010. Histoire naturelle de la sclérose en plaques. *Presse Med*, 39: 359-362.
57. Wekerle H. 2007. L'énigme de l'entrée des lymphocytes T auto-immuns dans les tissus nerveux centraux et de leur attaque contre les structures de myéline. *C. R. Biologies*. 330: 1-12.
58. Wiertlewski S et Thibault M. 2013. Vivre avec la sclérose en plaques. P 7-9.

REFERENCES

59. Cours médecine en ligne. 2013. La sécrétion salivaire. Disponible sur : <http://www.coursmedecine.info/physiologie/secretion-salivaire.html>. (Consulté le 12 Mars 2015)
60. Merlin J.L. 2013. Les biomarqueurs moléculaires en oncologie. (en ligne). Disponible sur : https://books.google.fr/books?id=vRdRBAAAQBAJ&pg=PA20&dq=biomarqueurs+types&hl=fr&sa=X&ei=wzFVVdCwLKar7Ab_loDoBw&ved=0CCkQ6AEwAA#v=onepage&q=biomarqueurs%20types&f=false. (Consulté le 20 Mai 2015)
61. Science et avenir. 2008. La salive pour remplacer les prises de sang. (en ligne). Disponible sur : <http://www.sciencesetavenir.fr/sante/20080326.OBS6728/la-salive-pour-remplacer-les-prises-de-sang.html>. (Consulté le 11 juin 2015).
62. CHU Bicêtre 2013. Description clinique de la SEP. Disponible sur : www.arsep.org/fr/24-description-clinique.html. (Consulté le 23 Mars 2015).

Solution mère d'acrylamide à 40% (à préparer avec gants et masque)

- ❖ Acrylamide 40 g
- ❖ Eau distillée 100 ml

Solution mère de bisacrylamide à 2% (à préparer avec gants et masque)

- ❖ Bisacrylamide 2 g
- ❖ Eau distillée 100 ml

Solution d'ammonium persulfate à 1% (à préparer temporairement)

- ❖ APS 0,1 g
- ❖ Eau distillée 10 ml

Solution stock de SDS à 10%

- ❖ Sodium Dodécyl Sulfate 10 g
- ❖ Eau distillée 100 ml

Tampon Tris HCl pH 6,8 (à préparer sous la hotte avec gants et masque)

- ❖ Tris 30,285 g
- ❖ Eau distillée qsp 200 ml
- ❖ Ajuster à pH 6,8 avec du HCl fumant 19,5 ml
- ❖ Eau distillée qsp 250 ml

Tampon Tris HCl pH 8,8 (à préparer sous la hotte avec gants et masque)

- ❖ Tris 60,57 g
- ❖ Eau distillée qsp 400 ml
- ❖ Ajuster à pH 8,8 avec du HCl fumant 8 à 10 ml
- ❖ Eau distillée qsp 500 ml

Tampon de migration

- ❖ Glycine 70,55 g

ANNEXE

- ❖ Tris 15 g
- ❖ SDS 2 g
- ❖ Eau distillée qsp 5000 ml

Solution de coloration (pour deux gels)

- ❖ TCA 60% 100 ml
- ❖ Solution mère de bleu de Coomassie R250 25 g
- ❖ Eau distillée qsp 5000 ml

Solution mère de bleu de Coomassie R250

- ❖ Bleu de Coomassie R250 10 g
- ❖ Ethanol 95° qsp 1000 ml

Composition des gels d'électrophorèse

Gel de séparation (runing gel): T : 12,58% C : 0,97%

- ❖ Acrylamide 40% 12,4ml
- ❖ Bis acrylamide 2% 2,4ml
- ❖ Eau permutée 8,6ml
- ❖ Tampon Tris - HCL pH 8,8 15,2ml
- ❖ SDS 10% 0,40ml
- ❖ APS 1% 1ml
- ❖ TEMED 0,020ml

Gel de concentration(stackig gel): T : 2,88 % C : 1,42%

- ❖ Acrylamide 40% 1ml
- ❖ Bis acrylamide 2% 0,3ml

ANNEXE

❖ Eau permutée	10,2ml
❖ Tampon Tris - HCL pH 6,8	1,7ml
❖ SDS 10%	0,14ml
❖ APS 1%	0,70ml
❖ TEMED	0,014ml

Tableau 02: Diagrammes types des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS-PAGE

SUMMARY

Multiple sclerosis (MS) is an auto immune chronic inflammatory disease of the SNC, which is characterized by clinical disorders. Multiple plates demyelinations scattered throughout the white matter without order specifically are observed.

The purpose of our work is to explore the salivary proteome of patients with multiple sclerosis with its different evolutionary forms and compare it to that of their serum using dimension al electrophoresis technique.

This method allow to obtain protein profiles clearly separated and reproducible for both biological fluids, where 48 protein bands of mobility and different intensity were detected in salivary proteins (protein bands of 25 and 23 HPM protein bands of FPM), and identify some proteins capable to be salivary biomarkers of disease (B1, B2, and B3). The serum electrophoretic profiles of all patients and the witness are very close to see similar except some variables quantitatively and qualitatively protein bands (A, B, C, D, E and F).

The hierarchical classification of patients based on their obtained diagrams was not correlated with the physiological state of patients.

The exploration of the variation in salivary proteins may serve as tools for diagnosis of multiple sclerosis.

Key words: multiple sclerosis, demyelination, electrophoresis

الملخص

هو مرض عصبي مناعي ذاتي مزيل لميالين الجهاز العصبي المركزي، والتي (MS) التصلب اللوحي المتعدد تتميز بانتشار جروح متعددة في المادة البيضاء. تشخيص هذا المرض يستند أساسا على التشخيص السريري والإشعاعي ، ولكن التشخيص الأكيد للمرض يحتاج للفحوصات المخبرية التي تعتمد على تحليل السائل النخاعي الهدف من هذا العمل هو استكشاف بروتينوم اللعابية لمرضى التصلب المتعدد مع أشكاله التطورية المختلفة وذلك لمقارنة هذا المصل من خلال استخدام تقنية الهجرة الكهربائية.

يسمح هذا الأسلوب بالحصول على لمحات من مجموع البروتينات مفصلة بوضوح لكل من السوائل البيولوجية، حيث تم الكشف عن 48 نطاق بروتيني ذات تنقلات وكثافة مختلفة في البروتينات اللعابية (25 نطاق للبروتينات ذات وزن جزيئي مرتفع و 23 نطاق للبروتينات ذات وزن جزيئي منخفض ، وتحديد بعض البروتينات التي من المحتمل أن تكون مؤشرات حيوية لعابية للمرض (B3، B2، B1) . لمحات الهجرة الكهربائية للمصل لجميع المرضى والشاهد قريبة جدا و متشابهة إلا بعض النطاقات البروتينية المتغيرة كما و كيفا (A, B, C, D, E, F). استكشاف التباين في البروتينات اللعابية قد تكون بمثابة أدوات لتشخيص مرض التصلب المتعدد.

الكلمات المفتاحية : التصلب اللوحي المتعدد، الميالين، اللعاب، الهجرة الكهربائية

BOUACIDA Kaltoum SAHLI Sara	Date de soutenance : 01/07/2015
Thème : Recherche des biomarqueurs dans la salive et le sérum des patients atteints de la sclérose en plaques	
Diplôme : Master de Biochimie, Option : Analyse protéomique et santé	
<p>La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire chronique auto-immune du système nerveux central, qui se caractérise par des troubles cliniques ayant pour cause la présence, sur les fibres nerveuses, de multiples plaques de démyélinisations disséminées dans la substance blanche sans ordre particulier, se succédant dans le temps.</p> <p>L'objectif de ce travail consiste à explorer le protéome salivaire des patients atteints de sclérose en plaque avec ses différentes formes évolutifs et de le comparer à celui de leurs sérum par utilisation des technique d'électrophorèse monodimensionnelle.</p> <p>Cette méthode a permis l'obtention des profils protéiques nettement séparés et reproductibles pour les deux liquides biologiques, où 48 bandes protéiques de mobilité et d'intensité différente ont été détectées pour les protéines salivaires (25 bandes protéiques de HPM et 23 bandes protéiques de FPM), et identifier quelques protéines susceptibles à être des biomarqueurs salivaires de la maladie (B1, B2, et B3). Les profils électrophorétiques sériques de tous les patients et le témoin sont très rapprochés voir similaires sauf quelques bandes protéiques variables quantitativement et qualitativement (A, B, C, D, E et F).</p> <p>La classification hiérarchique des patients en se basant sur leurs diagrammes types obtenus n'était pas corrélée avec l'état physiologique des patients.</p> <p>L'exploration de la variation des protéines salivaire peut servir comme outils de diagnostic de la sclérose en plaque</p>	
Mots clés : sclérose en plaque, démyélinisation, salive, électrophorèse	
<p align="center">Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologie Végétales, Département de Biochimie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri, Constantine 1</p>	
Jury de soutenance Président : BELLIL Inès Rapporteur : KHELIFI Douadi Examineur : GRAMMA Maamar	MCB- UFM Constantine Prof- UFM Constantine Chargé de cours- UFM Constantine