

ESSAI D'UTILISATION D'UNE MÉTHODE MATHÉMATIQUE D'INTERPRÉTATION QUANTITATIVE DES SÉPARATIONS ÉLECTROPHORÉTIQUES INCOMPLÈTES

Cl. LABOUCHE

*Institut d'Élevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux,
Laboratoire national de Recherches vétérinaires, Dakar (Sénégal)*

SOMMAIRE

Une méthode mathématique de calcul des courbes de Gauss, basée sur la mesure des coordonnées de deux points autres que le sommet a été appliquée à l'interprétation quantitative des séparations électrophorétiques incomplètes. Celle-ci se heurte, en pratique, aux erreurs de détermination des abscisses de ces points, compte tenu d'un phénomène de déplacement latéral des sommets observé lorsque deux courbes de Gauss viennent à se chevaucher.

Nous avons précédemment exposé les bases mathématiques d'une méthode permettant de reconstituer une courbe gaussienne et d'en déterminer la surface, lorsque sont fournies les coordonnées de deux points pris en dehors du sommet, (LABOUCHE, 1962 c). Appliquée aux électrophorégrammes du sérum des Ruminants domestiques pour lesquels on sait que la séparation des constituants protéiques est souvent insuffisante (LABOUCHE, 1962 b, Rapport Lab. nat. Rech. vét. Dakar, 1959/60), cette technique devrait permettre, en principe, la reconstitution, de proche en proche, des courbes de Gauss dont la succession et les chevauchements déterminent les contours du diagramme densitométrique.

1^o PRINCIPE

On peut envisager l'exploitation de ces diagrammes de la manière suivante (figure 1).

La mesure des coordonnées (U_1, Z_2) et (U_2, Z_2) permet de tracer la courbe (A) et de déterminer les ordonnées U'_1 et U'_2 des points d'abscisse Z'_2 et Z . Si E'_1 on appelle E_1 et E_2 les ordonnées des points correspondants de l'électrophorégramme, on aura :

$$E_2 = U'_1 + a_1$$

$$E_2 = U'_2 + a_2$$

a_1 et a_2 étant des ordonnées des points correspondants de la courbe (α), dont on déterminera les abscisses par rapport au pic P. On pourra alors dessiner la courbe (α). On pourra de même préciser les limites des courbes (β) et (γ).

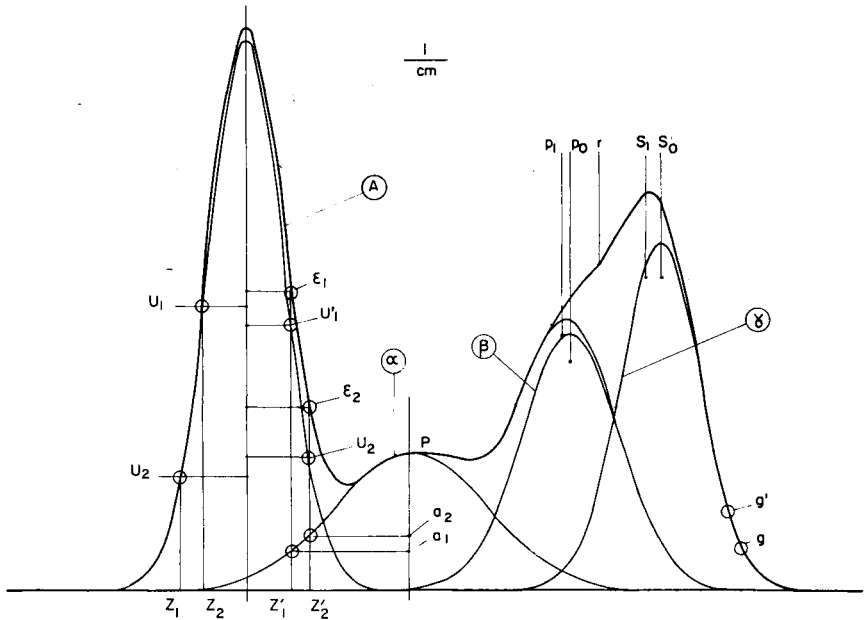


FIG. 1. — Décomposition d'un électrophorégramme en courbes de Gauss

p_0 = position du sommet de la courbe (β); p_1 = nouvelle position du sommet de (β) due au chevauchement de (α); r = ressaut apparaissant à la suite du chevauchement simultané des courbes (α), (β), (γ); s_0 = position du sommet de la courbe (γ); s_1 = nouvelle position après chevauchement de (γ) par (β).
Pour la signification des autres symboles voir le texte.

Remarquons la possibilité de partir des coordonnées de deux points G et G' pour déterminer les courbes (γ) puis (β). En fait, on utilisera simultanément les deux procédés pour le calcul de la courbe (β) dans les cas où les trois courbes (α), (β), (γ) viendraient à se chevaucher.

2° INFLUENCE DE LA PRÉCISION DES MESURES SUR CELLE DES RÉSULTATS OBTENUS

a) Mesure des ordonnées

Nous avons déjà montré que la méthode s'accommode d'une erreur dans la mesure des ordonnées qui peut parfois dépasser celle que l'on effectue normalement dans la détermination pratique des longueurs sur un papier millimétré (LABOUCHE, 1962 c).

Il importera cependant de s'assurer, qu'au niveau des points U_1 , U_2 , il n'existe pas de chevauchement des courbes.

Prenons un exemple, la courbe (α) empiète-t-elle sur la courbe A au niveau des points U_1 et U_2 (figure 1). Pour répondre à la question, il suffit de calculer l'ordonnée

des points (α) d'abscisses égales respectivement à $(\Delta + Z_1)$ et $(\Delta + Z_2)$, Δ étant la distance entre les sommets de (A) et de (α).

Cependant nous ne connaissons pas les paramètres k et n de la courbe (α), qui nous permettraient d'effectuer rapidement le calcul. Par contre, on peut déterminer k_1 et n_1 pour la courbe de sommet P. Celle-ci, provenant du chevauchement possible de A et de α (peut-être de β) sera de sommet plus élevé et de forme plus évasée que la courbe (α). De sorte que s'il est prouvé que U_1 et U_2 ne sont pas perturbés par (P) ; il sera prouvé *a fortiori* qu'ils ne sauraient l'être par (α). Les conditions dans lesquelles les paramètres de (P) peuvent être déterminés ont été exposées dans une note antérieure LABOUCHE Cl., 1962 a).

Remarquons la nécessité de l'individualisation du pic P pour effectuer la vérification ci-dessus. Celle-ci ne peut être obtenue si ce sommet n'est pas apparent. Inversement, si on postule que les points U_1 et U_2 ne sont pas perturbés par (α), on peut déduire, dans des conditions exposées plus loin, l'emplacement réel du sommet de la courbe (α).

b) Mesure des abscisses

Habituellement cette mesure ne présente pas de difficulté lorsque les diagrammes sont reportés sur un papier millimétré. Il suffit de prendre les points se trouvant à l'intersection de deux lignes de quadrillage pour obtenir avec une précision suffisante, la distance séparant le sommet de la courbe, des points choisis. (Le sommet étant lui même centré sur une verticale.)

On peut néanmoins se demander dans quelle mesure cette distance est bien égale à l'abscisse. Autrement dit, le sommet S de la courbe (A) est-il toujours sur la même verticale que le sommet correspondant S_e de l'électrophorégramme? S'il n'en était pas ainsi, la mesure de Z_1 et Z_2 serait systématiquement entachée d'erreur et la précision de la méthode serait à reconsidérer (fig. 1).

Or nous avons incidemment signalé dans un travail antérieur (LABOUCHE, 1962 b) que le chevauchement de plusieurs courbes pouvait provoquer un déplacement latéral plus ou moins important du sommet apparent.

L'attention des expérimentateurs ne paraissant pas avoir été à notre connaissance, attirée sur ce point particulier, nous l'illustrerons d'un exemple numérique tiré de la figure 1.

Les ordonnées U des points d'abscisse Z de la courbe (γ) ($kn = 153$; $k/n = 7$), aux approches du sommet sont mentionnées dans le tableau ci-dessous.

Z, mm	U, mm	U', mm
— 5	47,3	67,2
— 4	51,8	68,9
— 3	55,7	70,1
— 2	58,6	70,6
— 1	60,4	70,3
0	61	68
+ 1	60,4	66,8
+ 2	58,6	63,7
+ 3	55,7	59,7
+ 4	51,8	54,8
+ 5	47,3	49,6

Supposons maintenant que la courbe (β) ($nk = 112,8$; $k/n = 8,6$) se superpose à (γ) de telle manière que le sommet de (γ) en soit rehaussé de 8 mm. Les ordonnées

précédentes prennent alors les valeurs U' mentionnées dans la partie droite du tableau ci-dessus. Le sommet apparent se situe alors à $Z = -2$ mm.

Il devient donc indispensable ici de repérer la position réelle du sommet. On peut y parvenir connaissant 3 points de la courbe et la différence de leurs abscisses (fig. 2).

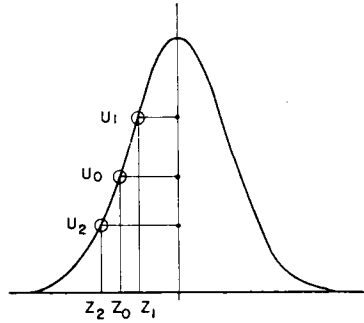


FIG. 2. — Calcul de l'emplacement du sommet connaissant trois points d'une courbe de Gauss et la différence de leurs abscisses

Soient $(U_1 Z_1)$, $(U_2 Z_2)$, $(U_0 Z_0)$ ces trois points avec : $(Z_0 Z_1) = (Z_0 Z_2) = z$, longueur connue. Le problème revient à calculer Z_0 .

Nous avons déjà vu (LABOUCHE 1962, a, b) que :

$$\text{Log } U_1 = -\frac{n^2}{2k^2} Z_1^2 + \text{Log } U_s$$

$$\text{Log } U_2 = -\frac{n^2}{2k^2} Z_2^2 + \text{Log } U_s$$

$$\text{Log } U_0 = -\frac{n^2}{2k^2} Z_0^2 + \text{Log } U_s$$

$$\text{Log } \frac{U_1}{U_0} = \frac{n^2}{2k^2} (Z_0^2 - Z_1^2) = V_1$$

$$\text{Log } \frac{U_2}{U_0} = \frac{n^2}{2k^2} (Z_0^2 - Z_2^2) = V_2$$

$$\frac{V_1}{V_2} = \frac{Z_0^2 - Z_1^2}{Z_0^2 - Z_2^2} = \frac{Z_0^2 - Z_0^2 - z^2}{Z_0^2 - (Z_0 + z)^2}$$

Une suite de calculs simples permet de déduire :

$$Z_0 = \frac{z}{2} \frac{\text{Log } U_2 - \text{Log } U_1}{\text{Log } U_1 + \text{Log } U_2 - 2 \text{Log } U_0}$$

expression qui se simplifie en prenant $z = 2$ mm. :

$$Z_0 = \frac{\log U_2 - \log U_1}{\log U_1 + \log U_2 - 2 \log U_0} = \frac{\log \frac{U_2}{U_1}}{\log \frac{U_1 \cdot U_2}{U_0^2}}$$

Détermination de l'erreur maxima susceptible d'intervenir dans le calcul de Z_0 :

Z_0 est fonction des variables indépendantes U_1, U_2, U_0 qui sont respectivement déterminées à dU_1, dU_2, dU_0 près. Z_0 sera donc connu à dz_0 près ; on peut montrer que l'erreur relative sur Z_0 est égale à :

$$\frac{dZ_0}{Z_0} = \frac{\varepsilon}{2,3 \log \frac{U_1 \cdot U_2}{U_0^2}} \left[\left(\frac{1}{\log \frac{U_2}{U_1}} \left[\frac{1}{U_1} \left(\log \frac{U_1^0}{U_2^2} \right) + \frac{1}{U_2} \log \frac{U_1^2}{U_0^2} \right] \right) + \frac{2}{U_0} \right]$$

en supposant, pour simplifier, que $dU_2 = dU_1 = dU_0 = \varepsilon$.

Mais si dans cette expression, on remplace les symboles par des chiffres, on voit alors apparaître des valeurs importantes pour l'erreur, même pour une bonne précision dans la connaissance des ordonnées.

Ainsi, pour une courbe de type (β) ($kn = 112,8$; $n/k = 0,1163$), tracée sur papier millimétré, nous avons relevé les coordonnées suivantes :

$$\begin{array}{ll} U_1 = 23 \text{ mm} & Z_1 = 10 \text{ mm} \\ U_0 = 17 \text{ mm} & Z_0 = 12 \text{ mm} \\ U_2 = 12 \text{ mm} & Z_2 = 14 \text{ mm} \end{array}$$

Les valeurs réelles des ordonnées, telles que les donne le calcul étaient respectivement 22,96 mm, 17,08 mm, 12,04 mm. Les variations dU_1, dU_0, dU_2 étaient égales alors à $+4 \cdot 10^{-2}$ mm ; $-8 \cdot 10^{-2}$ mm, $-4 \cdot 10^{-2}$ mm. Le tout a entraîné une erreur relative sur Z_0 de 15,4 p. 100 soit un décalage du sommet de 1,86 mm, comparable à la déviation latérale qu'aurait pu provoquer un chevauchement de courbes.

CONCLUSION

Réalizable en théorie, l'interprétation mathématique des séparations électrophorétiques incomplètes achoppe sur la détermination exacte des abscisses de référence en raison de l'erreur effectuée sur la mesure des ordonnées.

Pourrait-on sensiblement améliorer la précision de ces dernières estimations ? Le problème reviendrait à mesurer des longueurs à 10^{-2} mm. près au moins. Cela paraît, a priori, difficilement réalisable en pratique, tandis qu'il n'est pas du tout assuré que la sensibilité et la fidélité des densitomètres permettent l'obtention de tracés à 10 μ près.

Les méthodes habituelles d'exploitation, ainsi que les mathématiques sont donc impuissantes à déchiffrer les fractionnements insuffisants. Il faut donc se résigner, à notre connaissance et en l'état actuel des choses, à n'accorder qu'une valeur très approximative aux électrophorèses quantitatives effectuées sur le sérum des ruminants domestiques. — en particulier au niveau des fractions α et β .

SUMMARY

TRIALS WITH A METHOD OF QUANTITATIVE MATHEMATICAL
INTERPRETATION OF INCOMPLETE ELECTROPHORETIC SEPARATIONS

The mathematical bases of a method which permits the re-plotting of a Gauss curve and the calculation of its surface when the co-ordinates are known for two points situated away from the peak of the curve have already been described (LABOUCHE, 1962 *c*).

Applied to the electrophoretic diagrams of domestic ruminant serum, the separation of the protein constituents of which is known to be inadequate (LABOUCHE 1962 *b*; Report Nat. Lab. Vet. Res., Dakar, 1959/60), this technique should, in principle, permit the gradual replotting of the Gauss curves, of which the succession and the overlapping determine the contours of the densitometric diagram.

In fact, the present study shows that, for mathematical interpretation to be possible, it is necessary to determine with precision the true position of the curve peaks. But, there is sometimes an important displacement between the apparent peak on the electrophoretic diagram and the position occupied by the peak of the corresponding Gauss curve (figure 1). The true position can be determined precisely by calculation; but the ordinates must be known up to almost 10^{-2} mm. Such precision can not be obtained in practice. Hence, incomplete electrophoretic separations can not be interpreted mathematically and the electrophoresis of domestic ruminant serum will furnish only very approximate quantitative data.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- LABOUCHE Cl., 1962 *a*. Méthode mathématique d'interprétation quantitative des électrophorèses sur papier. *Ann. Inst. Pasteur.*, **102**, 561-566.
- LABOUCHE Cl., 1962 *b*. Calcul d'erreur dans l'interprétation quantitative des électrophorèses de sérum des bovidés. *Ann. Biol. Anim. Bioch, Biophys.* (sous presse).
- LABOUCHE Cl., 1962 *c*. Bases mathématiques d'une interprétation éventuelle des séparations électrophorétiques incomplètes. *Ann. Biol. Anim, Bioch, Biophys.* (sous presse).
- Rapport sur l'activité du Laboratoire national de Recherches vétérinaires de Dakar-Hann, 1959- 1960.