

Le pepsinogène et la prochymosine des bovins : connaissances actuelles, applications et perspectives dans la stratégie de lutte contre les verminoses gastrointestinales

SIDIKOU I.D.^{a,b}, REMY B.^a, HORNICK J.L.^c, LOSSON B.^d, DUQUESNOY N.^a,
YENIKOYE A.^b, BECKERS J.F.^a

^a Département des Sciences fonctionnelles, Service de Physiologie de la Reproduction, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Bd de Colonster, 20 - Bât. B41, 4000 Liège, Belgique.

^b Département des Productions animales, Faculté d'Agronomie, Université Abdou Moumouni de Niamey, BP 10960 Niamey, Niger.

^c Département des Productions animales, Service de Nutrition des animaux domestiques, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Bd de Colonster, 20 - Bât. B41, 4000 Liège, Belgique.

^d Département des Maladies infectieuses et parasitaires, Service de Parasitologie et Pathologie des Maladies parasitaires, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Bd de Colonster, 20 - Bât. B41, 4000 Liège, Belgique.

Correspondance : Prof. J.F. Beckers, Tél.: +32(0)4/366.41.61; fax: +32(0)4/366.41.65

E-Mail : jfbeckers@ulg.ac.be

RÉSUMÉ

La caractérisation des protéases aspartiques gastriques et surtout la compréhension de leurs mécanismes d'activation permet de nombreuses applications dans des domaines variés comme l'utilisation de la chymosine pour ses capacités coagulantes dans l'industrie fromagère ou le diagnostic des pathologies digestives en médecine humaine et vétérinaire. Ainsi, chez les bovins, le dosage indirect de l'activité enzymatique liée au pepsinogène est utilisé largement pour le diagnostic des parasitoses à *Ostertagia* sp.

Aujourd'hui, les strongyloses gastriques posent d'énormes problèmes de conduite d'élevage auxquels s'ajoute l'émergence de résistance des parasites vis-à-vis des antiparasitaires. Aucune solution immédiate n'existe. Néanmoins, plusieurs pistes sont proposées telle que l'utilisation plus rationnelle des antihelminthiques notamment par le suivi du pepsinogène sanguin. Cette approche a retenu notre attention.

La présente revue décrit ces protéinases aspartiques gastriques bovines, plus spécifiquement le pepsinogène et la prochymosine. Cette approche nécessite l'étude de la structure des zymogènes, de leurs mécanismes d'activation et des méthodes de dosage dans le sang. Le manuscrit se terminera sur une mise au point traitant de l'importance des problèmes que posent les verminoses gastriques et sur l'intérêt du dosage du pepsinogène sanguin dans la gestion de ces pathologies chez les bovins.

1. INTRODUCTION

Aujourd'hui, les verminoses gastro-intestinales des ruminants continuent à poser de nombreux problèmes dans le secteur des bovins. Très fréquentes pendant la saison de pâturage, ces infestations parasitaires induisent des pertes importantes causées par la morbidité, voire même par la mortalité du bétail, par la baisse de productivité, sans compter le coût de la lutte chimique (Dimander *et al.*, 2000). Les méthodes de lutte sont le plus sou-

vent basées sur l'emploi de médicaments antihelminthiques. D'autres stratégies de traitements basées sur la phytothérapie avec les plantes riches en tannin ont été investiguées aussi et constituent une médecine complémentaire ou alternative. L'apparition de résistances aux médicaments antiparasitaires et la pression médiatique sur l'utilisation de ces médicaments sont les effets secondaires auxquels le secteur de l'élevage est confronté fréquemment (Conder et Campbell, 1995 ; Sangster, 2001).

Une partie du cycle évolutif des nématodes se passe chez l'hôte au niveau de la muqueuse digestive où se poursuit le développement des larves qui deviennent adultes. Ces transformations et la sortie des adultes provoquent une destruction locale de la muqueuse aboutissant à la formation de lésions.

Dès le milieu du siècle dernier, le dosage des protéases aspartiques gastriques, sécrétées au niveau des cellules des glandes gastriques, était la piste de prédilection qui permet de se

rendre compte de l'état de la muqueuse et de diagnostiquer les lésions gastriques. En effet, il a été établi que les protéases aspartiques gastriques se retrouvent dans le sang et les premiers travaux portant sur l'utilisation du dosage de l'activité enzymatique du pepsinogène dans le sang comme aide au diagnostic des pathologies gastriques (verminoses) remontent à plusieurs années.

L'étude des protéases a débuté dans les années trente, mais c'est à partir de 1945, avec l'introduction de nouvelles méthodes de séparation (chromatographie, électrophorèse...), que leur caractérisation (séquences en acides aminés, localisation des sites actifs, détermination des processus catalytiques...) a commencé. Il a fallu attendre 1965 pour que les travaux d'Anderson et collaborateurs démontrent leur intérêt en médecine vétérinaire. Les protéases aspartiques gastriques sont des enzymes protéolytiques retrouvées chez pratiquement tous les organismes vivants. Au niveau du tube digestif, elles sont responsables de la digestion des protéines alimentaires par hydrolyse des liaisons peptidiques. Elles sont sécrétées sous formes inactives appelées «proenzymes» ou «zymogènes». Une fois dans la lumière du tube digestif, elles deviennent actives sous l'action de l'acide gastrique ; l'enzyme active agit ainsi directement sur les liaisons peptidiques des protéines. Les essais de classification des protéases ont abouti à définir cinq grandes catégories à savoir : les protéases à sérine, les protéases à cystéine, les métalloprotéases, les protéases à thréonine et les protéases à acide aspartique. Le pepsinogène et la prochymosine appartiennent à ce dernier groupe qui comprend beaucoup d'autres protéases aspartiques. Les techniques de séparation ont permis l'identification de plusieurs formes structurales dont certaines ont été complètement séquencées comme c'est le cas du pepsinogène A de l'homme (Sogawa *et al.*, 1983), du porc (Pedersen et Foltmann, 1973 ; Lin *et al.*, 1989), de la poule (Baudys et Kostka, 1983), du lapin (Kageyama *et al.*, 1990), de la tortue (Hirasawa *et al.*, 1996) et récemment du bœuf (Munoz *et al.*,

2004) ; c'est le cas aussi du pepsinogène C humain (Hayano *et al.*, 1988), du rat (Ichihara *et al.*, 1986 ; Ishihara *et al.*, 1989) ; de la prochymosine B du veau (Foltmann *et al.*, 1977) et du porc (Foltmann *et al.*, 1981 ; Houen *et al.*, 1996). D'autres formes ont été séquencées partiellement comme les pepsinogènes B et C (ou progastricsine) du porc (Foltmann *et al.*, 1992 ; Nielsen et Foltmann, 1995).

Aujourd'hui, on sait que les protéases aspartiques sont constituées d'une seule chaîne polypeptidique avec un nombre assez variable d'acides aminés (350 à 380 résidus) possédant un prosegment situé du côté N-terminal et constitué de 35 à 49 acides aminés. A ce stade, les molécules sont dénuées d'activité protéolytique.

Après un rappel succinct des principales caractéristiques biochimiques des pepsinogènes et prochymosines et leur mécanisme d'activation, cette synthèse retracera l'historique des méthodes de dosage et leur utilisation en médecine vétérinaire.

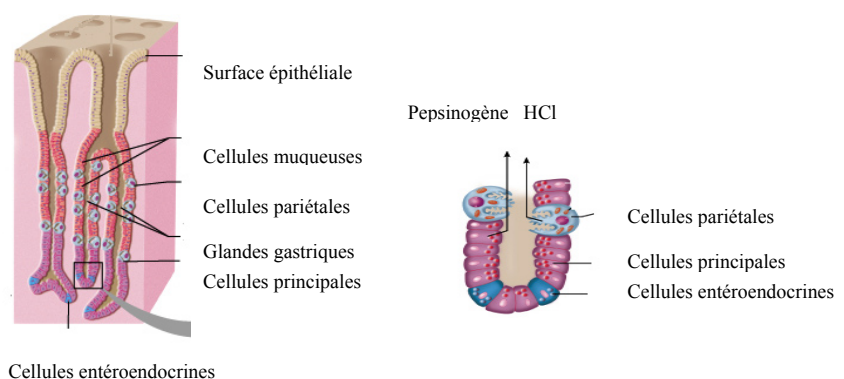
2. LOCALISATION TISSULAIRE DES PROENZYMES

La sécrétion du pepsinogène et de la prochymosine commence très tôt au cours de la vie fœtale même si elle semble très faible à ce stade de développement (comme indiqué un peu plus loin). Après la naissance et avant la différenciation et la maturation

des cellules gastriques, les mêmes cellules produisent simultanément le pepsinogène et la prochymosine. Après leur différenciation, la totalité des cellules principales et une partie des cellules muqueuses représentent la principale source de pepsinogène. La prochymosine, quant à elle, n'est produite que par les cellules muqueuses et une partie des cellules principales situées dans la zone supérieure de la glande gastrique (figure 1).

On sait que les protéases produites par les cellules principales du fundus sont converties en enzymes actives. Ce processus est sous contrôle de la production d'acide par les cellules pariétales, les deux types cellulaires étant stimulés par la gastrine. Selon Xu et Cranwel (1991), les faibles concentrations de pepsinogène chez les fœtus résultent de l'absence de la sécrétion de gastrine. En effet, cette hormone n'est détectable qu'au 93^e jour de la vie fœtale chez le porc et entre 75 et 80 jours chez le mouton (Read *et al.*, 1992). Ensuite, les concentrations plasmatiques en gastrine augmentent progressivement jusqu'à la naissance et atteignent leur pic à 3 et 2 semaines d'âge respectivement chez le porcelet et l'agneau. Cette libération de gastrine est elle-même sous contrôle vagal. Elle est contrôlée mécaniquement par la distension stomacale, puis chimiquement par des peptides, des acides aminés et le calcium. L'inhibition de la sécrétion de gastrine est régulée par l'acidité gas-

Figure 1 : Coupe d'une crypte gastrique avec agrandissement de la partie de la glande sécrétrice d'enzyme et d'acide (adaptée d'après Elaine N. Marieb).



trique et par des peptides régulateurs tels que la sécrétine, la somatostatine, les polypeptides vasoinhibiteurs, et les polypeptides inhibiteurs de la gastrine (Hansky, 1974).

Selon Andren (1992), la prochymosine est produite tôt pendant la vie prénatale dès la 10^e semaine de gestation. Après la naissance, sa production est sensiblement liée à la consommation de lait (Andren *et al.*, 1980). Les pepsinogènes A et C commencent à être produits plus tard pendant la vie prénatale (20^e semaine), et sont exprimés à de faibles niveaux aussi longtemps que le veau reçoit du lait. Une étude de Guilloteau et collaborateurs (1982) indiquait qu'entre 79 et 94 % de contenu enzymatique total est fourni par le fundus chez le jeune veau, et que l'augmentation des potentialités de sécrétion enzymatique avec l'âge était due à l'augmentation des surfaces sécrétoires de la zone ventrale du fundus au détriment de la face dorsale. En effet à la naissance, l'appareil gastro-intestinal doit s'adapter au changement de mode de nutrition qui passe d'un type parentéral à un type entéral. En vue de cette transition, l'appareil gastro-intestinal se développe très rapidement dans les semaines avant la naissance (Sangild *et al.*, 2000).

De nombreuses études décrivent l'influence de l'âge, du régime alimentaire et du sevrage sur les sécrétions enzymatiques abomasales du veau (Garnot *et al.*, 1974 ; Garnot *et al.*, 1977 ; Guilloteau *et al.*, 1984 ; Guilloteau *et al.*, 1985 ; Andren et Bjorck, 1986). Chez le veau nouveau-né, il a été rapporté la présence dans la caillette de concentrations de chymosine plus élevées que celles de la pepsine (Garnot *et al.*, 1977 ; Guilloteau *et al.*, 1984). Il a été également rapporté que la consommation de nourriture solide fait diminuer la sécrétion de prochymosine et augmenter celle du pepsinogène. Guilloteau et collaborateurs (1983) ont rapporté que, chez l'agneau, les quantités d'enzymes gastriques par rapport au poids vif augmentent légèrement entre la naissance et 2 jours d'âge tandis que celles de la prochymosine diminuent.

Avec l'âge, le pepsinogène A devient le zymogène dominant dans la muqueuse abomasale. Mais, la majeure partie des cellules fundiques conservent la capacité de produire chacun des trois zymogènes (pepsinogène A, pepsinogène C et prochymosine). D'après Andren et collaborateurs (1982), ces zymogènes sont co-localisés dans les mêmes granules de sécrétion au sein de ces cellules.

L'expression des protéases dans la muqueuse gastrique se modifie donc chez les mammifères adultes, vraisemblablement en fonction des habitudes alimentaires. D'une façon générale, les taux ont tendance à être plus élevés chez les mammifères herbivores (Kageyama *et al.*, 1991 ; Kageyama et Takahashi, 1984) que chez les omnivores et les carnivores (Furihata *et al.*, 1980 ; Kageyama *et al.*, 1992). Ceci suggère que les mammifères ingérant des aliments pauvres en protéines ou herbacés aient besoin de davantage de pepsinogène pour obtenir une digestion efficace. Mais cette hypothèse n'est pas vérifiée chez toutes les espèces car des niveaux très bas ont été rapportés chez la chèvre. D'après les études de Suzuki et collaborateurs (1999), la proportion de pepsinogène par gramme de muqueuse gastrique est de 0,54 mg chez l'espèce caprine. Alors qu'elle se situe entre 1,8 et 4,3 mg chez les bovins (Andren *et al.*, 1980), elle est de 3,4 mg chez l'homme (Kageyama et Takahashi, 1980) et de 8,6 mg chez le lapin (Kageyama et Takahashi, 1984). Bien que les ruminants soient des herbivores typiques, leur estomac vrai (abomasum) est aussi adapté pour la digestion d'aliments à haute valeur protéique (présence de microflore).

Chez le lapin (Kageyama et Takahashi, 1984) et les carnivores tel que le chien (Narita *et al.*, 2001), le pepsinogène A est le composant majoritaire, le pepsinogène C n'ayant pas été isolé. En général, le pepsinogène A est exclusivement sécrété par la muqueuse fundique, alors que le pepsinogène C est sécrété par les muqueuses fundique, pylorique et proximale (Foltmann, 1981). La distribution tissulaire des protéinases asparti-

ques semble principalement limitée à l'estomac. Cependant, le pepsinogène C a également été localisé dans d'autres tissus tels que le poumon, les vésicules séminales, le pancréas et la prostate principalement chez l'homme (Moriyama *et al.*, 1983 ; Szecsi *et al.*, 1987 ; Szecsi *et al.*, 1988 ; Szecsi, 1992). Une expression du pepsinogène C dans l'œsophage a été aussi rapportée chez la grenouille (Yakabe *et al.*, 1991).

Il a été démontré qu'une faible quantité des protéases gastriques se retrouve physiologiquement dans le sang. Quand la muqueuse gastrique est endommagée, ces taux augmentent dans la circulation sanguine par un mécanisme non encore bien élucidé. Cependant, deux hypothèses sont avancées : la première implique l'augmentation de la perméabilité épithéliale et vasculaire qui augmenterait dans les deux sens comme en atteste le passage de grosses molécules telle que l'albumine du sang vers le milieu gastro-intestinal. Cette forte perméabilité permettrait aussi le passage du pepsinogène gastrique vers la circulation sanguine (Anderson *et al.*, 1966 ; Murray, 1969). La seconde hypothèse implique l'hypersécrétion directe du pepsinogène dans le sang par les cellules productrices (McKellar *et al.*, 1986). Dès lors, la détermination des concentrations sériques de pepsinogène a été rapidement perçue comme un élément de diagnostic des pathologies gastriques qui s'accompagnent de lésions tissulaires (Armour *et al.*, 1979 ; Plebani, 1993). Cet aspect sera abordé plus loin.

3. ISOLEMENT DES PROENZYMES

Les protéases aspartiques sont conventionnellement purifiées à partir d'extraits de muqueuse gastrique via une succession d'étapes incluant les précipitations salines, les chromatographies échangeuses d'anions et des filtrations sur gel. L'une des premières tentatives de purification du pepsinogène bovin par ces méthodes, devenues maintenant conventionnelles, a été réalisée en 1968 par Chow et Kassell. Plusieurs tentatives ont

suivi et le pepsinogène A s'est révélé être la forme majoritairement isolée. Ces études préliminaires ont permis d'identifier jusqu'à 4 isoformes de cette molécule (Meitner et Kassell, 1971 ; Lang et Kassell, 1971 ; Harboe et Foltmann, 1975 ; Eckersall et al., 1987). Ces isoformes sont structurellement identiques et diffèrent seulement au niveau de leur composition en phosphate organique. Depuis les travaux de Harboe et Foltmann (1975), les 110 premiers acides aminés du pepsinogène A bovin (bPgA) étaient connus, et il a fallu attendre 2004 pour que la séquence complète soit déterminée à partir du cDNA (Munoz et al., 2004). La forme C du pepsinogène bovin a été aussi identifiée mais peu de travaux ont porté sur sa caractérisation. En 1971, Antonini et Ribadeau-Dumas isolaient le pepsinogène C et indiquaient que l'activité enzymatique potentielle de cette forme était de trois fois inférieure à celle du pepsinogène A (par détermination du temps de coagulation de la caséine). Les travaux de Eckersall et collaborateurs (1987) confirmaient l'existence de la forme C du pepsinogène bovin. D'après leurs résultats, la proportion de la forme C par rapport à la forme A était de 1:30. En 1990, Mostofa et collaborateurs réussissaient à purifier ces deux formes dont 4 isoformes du zymogène A. Dans la limite des expériences qu'ils ont effectuées, ils ont établi que la forme C était plus proche de la prochymosine, et serait présente en plus grande quantité chez les veaux non sevrés que chez les bovins adultes.

La prochymosine bovine est aussi extraite à partir de caillette de veau et est convertie en chymosine active en milieu acide. La chymosine est employée comme agent de coagulation du lait dans la fabrication de fromage (présure). En effet, cette enzyme possède des capacités coagulantes très élevées envers les caséines du lait (surtout sur la kappa (k)-caséine). La prédisposition des caséines du lait à la coagulation est fonction de leur composition en phosphate. Les caséines Alpha S1, Alpha S2 et Beta sont fortement phosphorylées, elles se lient facilement aux ions calcium facilitant ainsi leur coagulation spontanée.

Quant à la k-caséine, elle ne possède qu'un seul résidu de phosphate, ce qui explique sa très faible coagulation spontanée. En plus la k-caséine, par réaction hydrophobe avec les autres caséines, est capable de les stabiliser (jusqu'à 10 fois son poids) et de les empêcher de coaguler. L'action de la chymosine consiste donc en l'hydrolyse de cette k-caséine en la clivant à la position phénylalanine 105 et méthionine 106. Cette lyse libère les autres caséines qui réagissent enfin avec le calcium environnant aboutissant ainsi à la formation du caillot (Mohanty et al., 1999). Envers d'autres protéines, la chymosine de veau possède une faible activité protéolytique, ce qui la rend particulièrement appropriée à l'industrie fromagère. Le buffle, la chèvre, le mouton et le lapin semblent être aussi de bonnes sources de présure pour l'exploitation commerciale (Rao et Dutta, 1981). Bien que la capacité de coagulation de la chymosine bovine naturelle reste au moins 1,5 supérieure à toute autre, des sources alternatives microbiennes à partir d'*Escherichia coli* (Emtage et al., 1983), de *Saccharomyces cerevisiae* (Mellor et al., 1983 ; Goff et al., 1984), d'*Aspergillus spp* (Tsuchiya et al., 1993), de *Trichoderma reesei* (Harkki et al., 1989) ont été largement étudiées, et sont intensivement utilisées en industrie fromagère (Beppu, 1983). De ce fait, la prochymosine bovine a été caractérisée principalement à partir du mRNA, du rDNA ou bien du cDNA (Emtage et al., 1983 ; Zinovieva et al., 2002). L'enzyme existe sous trois formes principales : A, B et C dont la B est la plus abondante. Les chymosines A et B diffèrent au niveau de leur séquence par un seul résidu amino acide à la position 244 ; le zymogène A possède un résidu d'acide aspartique, contre un résidu glycine pour le zymogène B (Foltmann et al., 1977). La prochymosine C semble être un produit de dégradation de la forme A, avec perte de trois résidus de la position Asp286 à Phe288 (Danley et Goeghegan, 1988).

4. STRUCTURES PRIMAIRES DES PROENZYMES ET IDENTITÉS

Le pepsinogène A bovin se compose d'une chaîne polypeptidique possédant 372 acides aminés (Munoz et al., 2004), contre 381 acides aminés pour la prochymosine, avec des masses moléculaires respectives de 40.003 Da et 42.180 Da. Le prosegment ou segment N-terminal des zymogènes s'étend sur 45 résidus d'acide aminé pour le pepsinogène (Harboe et al., 1974) et 42 résidus pour la prochymosine (Foltmann et al., 1977).

La composition en acides aminés du pepsinogène A bovin et de la prochymosine B bovine (bPrB) est présentée dans le tableau I et comparée avec celle du pepsinogène A porcin (pPgA), des pepsinogènes A et C de l'homme et du pepsinogène F du lapin (rPgF). Le pepsinogène A bovin possède un peu plus de résidus acides (n = 39) que la prochymosine B (n = 36); et inversement, la composition du pepsinogène en résidus basiques est de moitié inférieure à celle de la prochymosine (16:30). Le pepsinogène A humain (hPgA) possède le même nombre de résidus acides que le pepsinogène A bovin, mais avec 2 résidus basiques de plus. Le pepsinogène A porcin semble contenir le plus de résidus acides (n = 45). Cependant, le pepsinogène F du lapin et la prochymosine B bovine, avec respectivement 32 et 30 résidus basiques, possèdent les rapports résidus acides/résidus basiques les plus faibles (1,3 et 1,2 respectivement).

Le pourcentage d'identité entre quelques protéases de la même famille, déterminé à partir de l'analyse des séquences déposées dans les banques de données, est indiqué dans le tableau II. Les pepsinogènes A de l'homme et du porc sont plus proches du pepsinogène A bovin (82 et 83 % d'identité respectivement) que la prochymosine B bovine (55 % d'identité). D'autre part, une très forte identité a été trouvée entre la prochymosine B bovine et la prochymosine B du mouton (94 %, valeur non montrée dans le Tableau II).

Il apparaît donc clairement que les protéases d'une même espèce peuvent être très différentes du point de vue de leur séquence en acide aminé, et être plus proches de la protéase équivalente d'une autre espèce.

5. MÉCANISME D'ACTIVATION DES PROENZYMES

L'une des premières études sur la cinétique d'activation montrait que le pepsinogène, en milieu acide (pH < 6)

pouvait s'activer spontanément (Herriott, 1938). L'étude de Meitner et Kassell (1971) sur le pepsinogène bovin indiquait que son activation était complète en 4 min à 0°C à pH 1,5-2,0 ou 2,5 alors qu'il fallait 1 heure à pH 3,0. Partant de ces travaux préliminaires, Hartsuck et collaborateurs (1977) démontraient que l'activation du pepsinogène à pH acide était non seulement dépendante du pH mais aussi du temps. C'est ainsi qu'il fut montré qu'à une concentration en pepsinogène de 1 mg/ml, à pH 1, plus des 2/3 de la protéine sont activés en pepsine en 16 secondes; alors qu'il fallait 32 secondes à pH 2. Pour un pH de 3 seulement 1/3 de la concentration en protéine totale est activé et ce en 48 secondes (Hartsuck *et al.*, 1977). En 1972, Al-Janabi et collaborateurs démontraient que le pepsinogène et la prochymosine étaient capables de s'activer par deux mécanismes différents : un mécanisme « intramoléculaire » et un mécanisme « autocatalytique ». Le mode intramoléculaire, où la molécule se digère elle-même, est accentué par la présence d'un pH acide (pH < 3) et d'une concentration protéique inférieure à 1 mg/ml (Hartsuck *et al.*, 1977), alors que le mode autocatalytique où les molécules enzymatiques se digèrent les unes les autres, devient dominant à de plus fortes concentrations en protéine.

Tableau I : Composition en acides aminés de quelques protéases aspartiques comparée à celles du pepsinogène A et de la prochymosine B des bovins.

	bPgA	pPgA	hPgA	rPgF	bPrB	hPgC
Ala	16	20	20	21	19	23
Cys	6	7	7	7	7	7
Asp	22	30	22	25	22	12
Glu	17	15	17	17	14	20
Phe	16	16	17	17	20	21
Gly	36	36	36	34	33	38
His	2	3	2	7	6	2
Ile	33	27	27	28	22	15
Lys	8	11	8	11	15	9
Leu	26	39	35	45	33	37
Met	5	5	7	8	9	9
Asn	18	16	18	14	15	17
Pro	16	18	21	24	16	19
Gln	16	14	17	12	26	27
Arg	6	4	8	14	9	6
Ser	52	48	44	36	36	39
Thr	27	27	28	14	24	26
Val	26	27	29	28	29	31
Trp	5	6	7	6	4	7
Tyr	19	17	18	20	22	23
Total aa	372	386	388	388	381	388
MM (Da)	40005	41376	41978	42787	42181	42427

Tableau II : Pourcentage d'identité entre le pepsinogène A bovin, le pepsinogène A du porc, le pepsinogène A humain et d'autres protéines de la même famille des protéases aspartiques (banque de données Suisse-Prot).

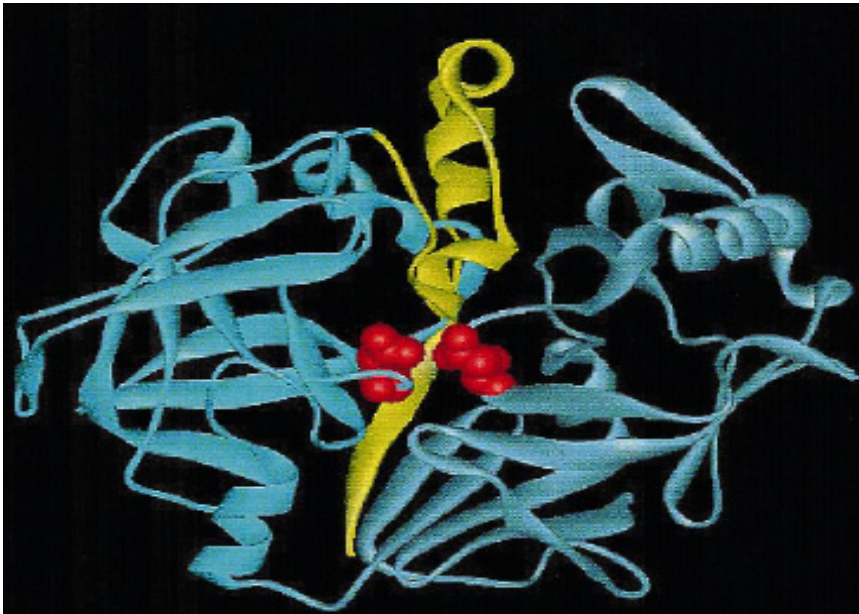
	Pepsinogène A bovin	Pepsinogène A porcin	Pepsinogène A humain
Pepsinogène A bovin (AN : AY330769)	100,0	83,5	82,1
Pepsinogène A porcin (AC : P00791)	83,5	100,0	82,5
Pepsinogène A humain (AC : P00790)	82,1	82,5	100,0
Pepsinogène A de la poule (AC : P00793)	58,7	61,5	61,5
Pepsinogène C humain (AC : P20142)	51,3	49,4	50,2
Pepsinogène C du rat (AC : P04073)	51,0	51,6	51,0
Pepsinogène F du lapin (AC : P27823)	56,0	55,5	56,4
Prochymosine B bovine (AC : P00794)	55,0	57,0	57,0
Prochymosine B ovine (AC : P18276)	55,0	54,6	55,6
PAG 1 bovine (AC : Q29432)	47,8	47,3	49,2
PAG 2 bovine (AC : Q28057)	47,2	48,0	48,3
PAG 1 ovine (AC : 28755)	47,9	48,0	51,1
PAG 1 porcine (AC : Q29078)	47,7	47,8	48,5
PAG 2 porcine (AC : Q29079)	47,5	46,8	48,5
PAG du cheval (AC : Q28389)	56,4	55,4	54,0

La détermination de la structure primaire par séquençage et de la structure tridimensionnelle par diffraction aux rayons X de plusieurs protéases a permis de mieux comprendre ces phénomènes catalytiques. Malgré le fait que les structures primaires d'un certain nombre de zymogènes gastriques aient été déterminées, les structures tridimensionnelles sont connues seulement pour le pepsinogène A du porc (James et Sielecki, 1986 ; Sielecki *et al.*, 1991 ; Hartsuck *et al.*, 1992), le pepsinogène A de l'homme (Bateman *et al.*, 1998) et le pepsinogène C de l'homme (Moore *et al.*, 1995). Les structures globales des trois zymogènes sont semblables ; cependant, la similitude entre les pepsinogènes A porcin et humain est plus grande qu'entre les pepsinogènes A et C de l'homme.

Photo 1 : Structure tertiaire du pepsinogène A porcine.

Modèle de structure tridimensionnelle des protéases aspartiques : les deux bras de l'enzyme (les segments N-terminal et C-terminal) en bleu sont disposés en symétrie, le segment inhibiteur (porté par le N-terminal) en jaune occupe le site actif de l'enzyme représenté par les deux aspartates ici en rouge.

Photo reproduite avec la permission (ref. BJ050034) de Richter C., Tanaka T. and Yada R.Y., 1998, *Biochemical Journal*, 335, 481-490. © the Biochemical Society.



La partie active des zymogènes se compose de deux domaines reliés par un axe de symétrie (photo 1). A la jonction entre les deux bras se trouvent les deux résidus d'acide aspartique (les résidus 78 et 261 pour le pepsinogène A bovin ; et les résidus 92 et 274 pour la prochymosine B bovine) formant ainsi le site catalytique de l'enzyme. Ce site est occupé par le prosegment bloquant ainsi l'entrée du substrat et maintenant le zymogène sous sa forme inactive à pH neutre. La conversion du pepsinogène en pepsine se produit spontanément en solution acide et comporte une ou plusieurs réactions. En 1974, Harboe et collaborateurs montraient que pendant l'activation du pepsinogène bovin à pH 2, un peptide inhibiteur est d'abord libéré (composé de 17 acides aminés) suivi par plusieurs autres peptides. L'exemple de la prochymosine est représenté dans la figure 2 indiquant l'étendue (en acides aminés) de la molécule entière synthétisée (préprochymosine) et celle de la molécule après la libération de la chaîne inhibitrice (prochymosine) suivi de la libération séquentielle ou directe du prosegment et formation de l'enzyme active (chymosine).

La libération directe du prosegment se produit à pH 4,5 ; le propeptide (appelé aussi peptide d'activation) comportant les résidus 1-43 de la prochymosine est coupé et la réaction produit directement la chymosine. La libération en plusieurs étapes quant à elle se fait à pH 2 ; la réaction d'activation fournit un produit appelé « pseudochymosine » par libération d'un propeptide comportant les résidus 1-27 de la prochymosine. Une fois formée, la pseudochymosine est relativement stable à un pH inférieur à 3 ou supérieur à 6, mais lorsque incubée à pH 4.5, elle perd les résidus 28-43 et se transforme en chymosine active.

6. MÉTHODES DE DOSAGE

Les premiers essais sur la mesure de l'activité de la pepsine ont vu le jour dès 1932 avec les travaux de Anson et Mirsky. Ces auteurs sont arrivés à estimer l'activité de la pepsine en milieu acide (pH 2) à 37°C, en utilisant l'hémoglobine comme substrat. Le principe de cette méthode se base sur le mécanisme d'activation

du pepsinogène en pepsine dans un milieu acide. La pepsine ainsi formée agit sur le substrat protéique (ici l'hémoglobine) dont elle hydrolyse les liaisons peptidiques libérant ainsi des résidus d'acides aminés. Du réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté à la solution finale. Ce réactif est un colorant des résidus tyrosines libérés permettant ainsi de lire la densité optique au spectrophotomètre. La méthode est donc de type enzymatique ou protéolytique dont le principe est présenté dans la figure 3.

Plusieurs adaptations de la méthode basées sur le même principe ont vu le jour (Berghen *et al.*, 1987 ; Dorny et Vercruysse, 1998 ; Kerboeuf *et al.*, 2002). Elles ont surtout apporté des améliorations techniques notamment en permettant le dosage dans des plaques multipuits ou l'utilisation de plus faibles quantités de sérum.

Chez les bovins, c'est seulement en 1977 (avec les travaux de Thode-Jensen) qu'un antisérum a été utilisé pour quantifier le pepsinogène. La nouveauté consistait en la mesure du pepsinogène par immunodiffusion radiale. Malheureusement, cette méthode est beaucoup plus qualitative que quantitative. Beaucoup plus tard, en 1994, une tentative de Gomes et collaborateurs a porté sur la mise au point d'un ELISA pour le dosage du pepsinogène dans le sang chez les bovins. Là aussi, les travaux n'ont pas eu de suite dans la littérature scientifique.

7. UTILISATION DU DOSAGE DE PEPSINOGENE

C'est dans les années cinquante que la relation entre les taux de pepsinogène sanguin et l'état de la muqueuse gastrique a été relevée chez les bovins (Mirsky *et al.*, 1950). Dès 1965, des études cliniques et épidémiologiques ont été menées pour une meilleure maîtrise des pathologies gastriques. C'est ainsi que la valeur de la mesure du pepsinogène sanguin a été proposée comme test de diagnostic de l'ostérite gastrique bovine (Anderson *et al.*, 1965), et par la suite, des valeurs seuils du taux de pepsinogène

ont été proposées en fonction des infestations cliniques et subcliniques (Armour *et al.*, 1979). Le dosage du pepsinogène a été largement utilisé aussi chez l'homme comme technique de diagnostic des ulcères par exemple (Janowitz et Hollander, 1952 ; Lewin et Bonfils, 1968 ; Nagamachi et Nakamura, 1978), et chez le porc dans l'étude clinique des ulcères ou bien des infestations à *Hyostrogylus rubidus* (Enight *et al.*, 1972 ; Zamora *et al.*, 1975 ; Dangolla *et al.*, 1994). Cependant, il est apparu clairement

que l'activité enzymatique évaluée via les méthodes indirectes découle de la remarquable diversité des enzymes appartenant à la famille des protéinases aspartiques gastriques, incluant au moins deux types de pepsinogène, deux types de cathepsine, mais aussi les différentes formes de prochymosine (Samloff, 1989 ; Sidikou *et al.*, 2006). En effet, le mode et les conditions d'activation de ces protéases sont très similaires et les résultats des méthodes de dosage indirect sont surtout fonction du pH, de la température, du substrat

utilisé et de la longueur d'onde lors de la lecture au spectrophotomètre. Dans la diversité des méthodes publiées, des variations sont observées dans les facteurs précités modifiant ainsi les conditions de travail d'où les différences observées entre les données de la littérature. Pour bien illustrer cela, sera abordé, un peu plus loin, l'utilisation de la méthode indirecte de dosage du pepsinogène sanguin chez les bovins dans l'étude des parasitoses à *Ostertagia* (Edwards *et al.*, 1960 ; Anderson *et al.*, 1965).

Figure 2 : Processus de formation de la chymosine active par libération des différents segments polypeptidiques. La figure indique l'étendue (en acides aminés) de la préprochymosine (molécule entière synthétisée), de la prochymosine et de la chymosine active, mais aussi de la pseudo-chymosine qui se forme après libération d'un segment comportant les résidus 1-27 de la prochymosine. Une fois formée, la pseudo-chymosine est relativement stable à pH inférieur à 3 ou au-dessus de 6, mais se transforme en chymosine une fois incubée à pH 4.5.

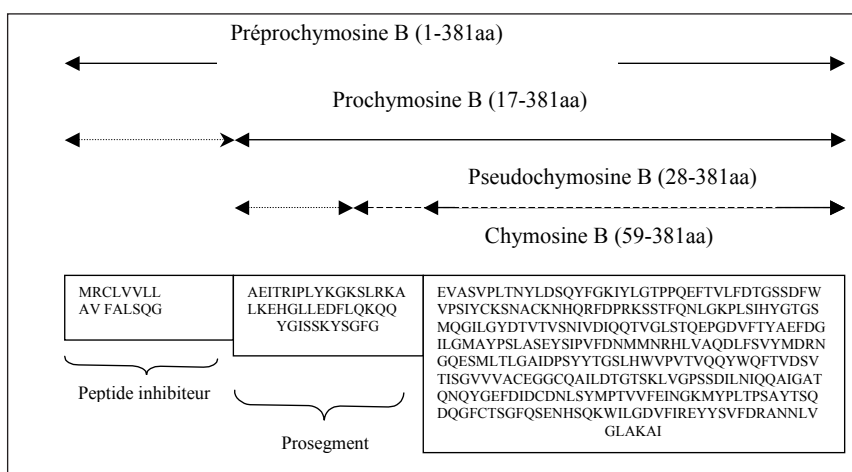
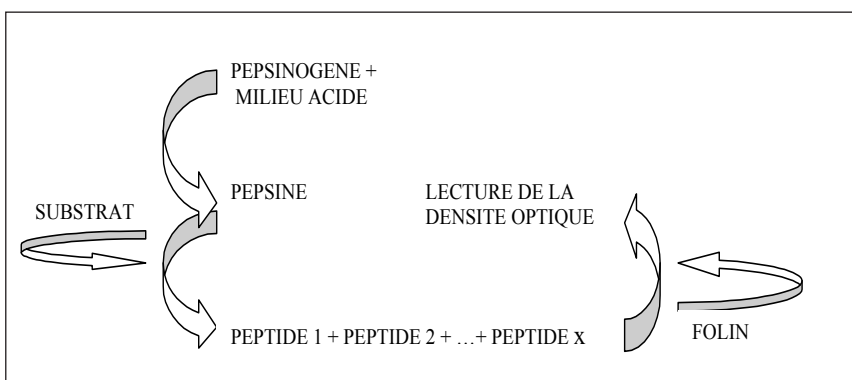


Figure 3 : Principe simplifié de la méthode de dosage enzymatique du pepsinogène. Après acidification du milieu, la pepsine hydrolyse le substrat en plusieurs petits peptides. La densité optique est lue au spectrophotomètre après coloration de la solution au réactif de Folin-Ciocalteus. La densité optique, lue à la longueur d'onde de 680 nm, est proportionnelle à la concentration en enzyme active.



Il est un fait que la méthode enzymatique a connu un certain essor au fil des décennies, bien qu'il lui ait été reconnu un manque de spécificité, ce qui a conduit à l'apparition des premières méthodes de dosages immunologiques spécifiques du pepsinogène chez l'homme (Samloff et Liebman, 1974 ; Ichinose *et al.*, 1982 ; Pals *et al.*, 1987 ; Biemond *et al.*, 1989) mais aussi chez le porc (Nappert *et al.*, 1990 ; Banga-Mboko *et al.*, 2003). En effet, chez l'homme, l'utilisation des méthodes de dosages radioimmunologiques des différentes formes de pepsinogène a permis de grandes avancées en matière de diagnostic de certaines pathologies gastriques. Rappelons que le pepsinogène A humain est sécrété par la muqueuse fundique, alors que le pepsinogène C est sécrété par les muqueuses fundique, pylorique et proximale. Le rapport entre les deux formes (A et C), réalisé à partir des résultats de dosages radioimmunologiques spécifiques, a été estimé autour de 5 chez le sujet normal (Biemond *et al.*, 1989). Dans le cas de l'ulcère duodénal, les concentrations des pepsinogènes A et C augmentent dans le sérum, mais le rapport (A/C) diminue. L'élimination d'*Helicobacter pylori* provoque des changements de valeur du pepsinogène sérique, les taux des pepsinogènes A et C sont simultanément réduits, mais le rapport A/C augmente (Biemond *et al.*, 1993 ; Wagner *et al.*, 1994 ; Bermejo *et al.*, 2001). Le dosage radioimmunologique a permis donc d'affiner le diagnostic de ces pathologies, mais aussi de révéler une relation directe entre le niveau de sécrétion de certaines formes

de zymogènes et la localisation des lésions gastriques.

Chez le porc également, le dosage radioimmunologique du pepsinogène A a été étudié depuis les années 1990 (Nappert *et al.*, 1990), mais ce sont les travaux de Banga-Mboko et collaborateurs (2003) qui amènent le plus de précision quant à son utilisation dans les études cliniques. Une étude comparative portant sur les deux méthodes radioimmunologique et enzymatique révèle une bonne corrélation chez les porcs sains, mais pas pour certains groupes d'animaux (fœtus, porcs malades) (Sidikou *et al.*, 2006).

Chez les bovins, les études sur le diagnostic des parasitoses gastro-intestinales par dosage du pepsinogène ont été menées partout dans le monde afin de parvenir à diagnostiquer les pathologies et de les traiter. C'est ainsi que plusieurs valeurs diagnostiques ont été rapportées (tableau III). Pour la même classe clinique, les valeurs rapportées peuvent varier du simple au double, et le cas le plus frappant pour des animaux témoins est une différence d'un facteur supérieur à 5 soit 396 mUtyr pour Jennings et collaborateurs (1966) et 3.020 mUtyr pour Zadnik et Mesaric (1999). Néanmoins, d'autres facteurs sont aussi à prendre en considération dans l'interprétation des valeurs dans la mesure où chaque étude est menée dans des conditions particulières. Le moment

de l'échantillonnage paraît avoir une influence car les concentrations du pepsinogène évoluent en fonction de l'âge des animaux ou bien de la saison. En bref, les concentrations du pepsinogène sanguin dépendent du mode de conduite d'élevage. Des veaux fortement exposés pendant la première saison de pâturage avaient des concentrations supérieures à 3.500 mUtyr (Vercruysse et Claerebout, 2001), et des concentrations en pepsinogène situées entre 1.500 et 2.000 mUtyr étaient indicatives d'une surprotection de ces jeunes veaux. Des veaux naturellement infestés en fin de première saison de pâturage en Belgique, et ayant bénéficié d'un traitement prophylactique présentaient des concentrations inférieures à 2.000 mUtyr contre 3.500 mUtyr pour le groupe non traité (Dorny *et al.*, 1999). En 1998, Shaw et ses collaborateurs ont tenté de passer en revue les paramètres d'évaluation des systèmes de management (type de pâture, taux d'infestation, nombre d'œufs excrétés, concentrations en pepsinogène), et l'effet des traitements prophylactiques (type d'anthelminthique utilisé, fréquence des traitements) sur l'élevage des bovins en première saison de pâturage, dans 13 pays européens (comprenant la Belgique, la France, l'Allemagne, le Danemark et le Royaume-Uni). Une différence marquée a été notée en ce qui concerne l'excrétion des œufs de parasites chez les animaux traités d'une part et ceux atteints de

parasitisme clinique ou subclinique d'autre part. Le dosage du pepsinogène a été réalisé dans seulement la moitié des études, au moyen de la méthode indirecte. Cependant, aucune analyse comparative n'a pu être réalisée du fait de la grande diversité des valeurs rapportées, même si le taux du pepsinogène sanguin est considéré comme le meilleur reflet du niveau d'exposition des veaux en première saison de pâturage (Hilderson *et al.*, 1989).

Chez l'homme et le porc, les méthodes radioimmunologiques ont montré une très grande efficacité diagnostique due à la grande spécificité des systèmes et leur utilisation a permis des avancées considérables. Cependant, chez les bovins, la méthode enzymatique est toujours utilisée sur le terrain et aucune méthode radioimmunologique n'a encore été rapportée.

8. PROBLÈMES LIÉS AU CONTRÔLE DES PARASITOSE GASTRO-INTESTINALES

L'utilisation de la chimiothérapie antiparasitaire a connu un développement considérable au siècle dernier et a permis de limiter les pertes économiques qui y étaient liées. En effet, chez les ruminants, les strongyloses digestives constituent l'une des entités les plus importantes d'un point de vue prévalence et chute de productivité. De

Tableau III : Valeurs diagnostiques (mUtyr/L/min) du pepsinogène sanguin en relation avec différentes pathologies gastriques chez les bovins.

Auteurs	Méthode de dosage	Contrôle	Infestation subclinique	Infestation clinique	Ulcères	Déplacement caillette	Leucose enzootique
Anderson <i>et al.</i> , 1966	Enzymatique	-	1.288	3.260	-	-	-
Jennings <i>et al.</i> , 1966	Enzymatique	396	1.000	3.500	-	-	-
Thode Jensen, 1977	Diffusion Radiale	1.500	-	4.200	-	-	-
Kerboeuf, 1979	Enzymatique	300-600	-	2.000-4.000	-	-	-
Harvey-White <i>et al.</i> , 1983	Enzymatique	1.400	2.900	> 3.500			-
Berghen <i>et al.</i> , 1987	Enzymatique	439	2.330	5.660	-	-	-
Shaw <i>et al.</i> , 1998	Enzymatique	-	3.500	5.500	-		-
Dorny <i>et al.</i> , 1999	Enzymatique	< 2.600	2.000-4.100	3.700-6.300	-	-	-
Zadnik et Mesaric, 1999	Enzymatique	3.020	-	-	-	5.250-5.770	-
Mesaric <i>et al.</i> , 2002	Enzymatique	2.450 ± 1.000	-	-	6.480 ± 1.800	-	3.350 ± 2.310

nombreux nématodes appartenant à l'ordre des *Strongylidae*, comprenant la super famille des *Strongyloidea* (*Chabertia*, *Oesophagostomum*, *Bunostomum*) et la super famille des *Trichostrongyloidea* (*Ostertagia*, *Haemonchus*, *Cooperia*, *Teladorsagia*, *Trichostrongylus*, *Nematodirus*) agissent souvent en association dans la genèse de ces affections digestives.

Les strongles digestifs ont un cycle biologique monoxène avec une phase libre dans le milieu extérieur où se développent les œufs jusqu'au stade larvaire L3, et une phase parasitaire qui commence après ingestion des larves infestantes par l'hôte. Chez ce dernier, les larves L3 poursuivent leur développement intestinal jusqu'au stade adulte. Après accouplement, les femelles adultes pondent des œufs qui sont rejetés dans la nature avec les excréments de l'hôte et un nouveau cycle recommence.

Chez l'hôte, le pouvoir pathogène des parasites découle surtout de leur mode de nutrition; certains sont hématophages, d'autres chymivores; la plupart produisent des produits d'excrétion/sécrétion contenant des enzymes digestives. Les signes extérieurs généraux se résument chez l'animal par un manque d'appétit, voire de l'anorexie liée à la charge parasitaire de l'estomac, de la malabsorption, de la diarrhée et des troubles métaboliques, le tout aboutissant à une diminution de la croissance des jeunes et de la production de lait et de viande chez les adultes. En ce qui concerne l'ostertagiose bovine, on distingue le type I qui se caractérise, à la fin de l'été et en automne le plus souvent par une atteinte clinique des veaux en première et seconde année de pâture: diarrhée abondante et verdâtre, amaigrissement et déshydratation. La morbidité est élevée, mais les mortalités sont faibles. Le type II survient avec la sortie des vers de l'état d'hypobiose. Cette forme qui apparaît à la fin de la stabulation hivernale est moins fréquente mais peut causer la mort en quelques semaines. Elle se traduit par une diarrhée profuse et continue, parfois par de la constipation et de l'anémie.

Les méthodes de diagnostic actuelles des parasitoses gastro-intestinales chez les bovins reposent essentiellement sur le laboratoire et tiennent compte de la saison, de l'âge des animaux, du type d'élevage et des vermifugations antérieures éventuelles. Deux types de méthodes coexistent: les méthodes parasitologiques (coproscopie quantitative, bilan parasitaire) et les méthodes sérologiques (dosage du pepsinogène). Dans la pratique, la coproscopie quantitative est la plus répandue car facile d'utilisation et peu onéreuse, mais le dosage du pepsinogène sanguin a connu également beaucoup de succès dans les études scientifiques. Cette méthode a été utilisée un peu partout dans le monde aussi bien chez l'homme que chez les animaux. Cependant, il est important de rappeler que cette technique ne permet malheureusement pas de réaliser des études comparatives à grande échelle comme l'ont démontré les études de Shaw et collaborateurs (1998).

En ce qui concerne la chimiothérapie, des progrès considérables ont été réalisés dans la mise au point de médicaments actifs et peu toxiques depuis les années '60. En 1961, le thiabendazole a été commercialisé en tant que premier antihelminthique combinant efficacité, large-spectre et faible toxicité. La découverte du thiabendazole et du lévamisole a fourni des composés avec une bonne activité (à une posologie se chiffrant en mg/kg de poids corporel), et a été suivie de la mise au point d'un autre groupe d'analogues structuraux, les benzimidazoles possédant aussi une excellente activité. Un autre pas sera franchi en 1981 avec la mise sur le marché de l'ivermectine, qui possède une activité même lorsqu'elle est administrée à une posologie s'élevant à 200 µg/kg de poids vif. Cette molécule et les autres membres plus récents de sa famille possèdent une excellente activité et un large spectre contre les nématodes. Cependant, l'utilisation massive de ces médicaments a entraîné assez rapidement l'apparition de résistance chez certaines espèces cibles.

8.1. Phénomène de résistance des parasites face aux antihelminthiques

Selon la définition de l'Organisation mondiale de la Santé: « une population chimiorésistante a génétiquement acquis la capacité de résister à des concentrations d'antiparasitaires habituellement létales pour les individus de cette espèce » (Beugnet et Kerboeuf, 1997). Cette capacité d'adaptation est évolutive et s'accroît tant que le médicament n'est pas utilisé sous les conditions optimales; autrement dit, ce phénomène de résistance découle d'une pression de sélection due à l'usage des antihelminthiques et à la présence de génotypes plus ou moins résistants dans la population de départ.

La première description d'une résistance aux antihelminthiques a concerné la phénothiazine (introduite en 1940) et ceci vers la fin des années '50 et le début des années '60. Le phénomène a été observé chez les moutons infestés par *Haemonchus contortus* et chez les chevaux infestés par les cyathostominés (Drudge *et al.*, 1957; Drudge et Elam, 1961). La situation actuelle au niveau mondial concernant la résistance des parasites aux antihelminthiques reste difficile à décrire avec précision du fait de la grande diversité des molécules, des parasites et des hôtes concernés mais aussi parfois par le manque de données publiées. Géographiquement, des cas de résistance sont apparus partout dans le monde. De nombreux cas de résistance aux trois principaux groupes d'antihelminthiques (benzimidazoles, imidazothiazoles et lactones macrocycliques) ont été observés dans certains pays. En Australie et en Nouvelle-Zélande, la résistance aux benzimidazoles semble la plus répandue car elle a été rapportée chez presque toutes les espèces. En Australie, dans certaines zones, une résistance aux benzimidazoles, au lévamisole et au morantel a été observée dans 80 % des élevages ovins mais aussi chez les caprins. Plusieurs cas concernant les lactones macrocycliques ont été également rapportés (Waller, 1997). En Nouvelle-Zélande, la résistance concerne presque toute la gamme des antihelminthiques incluant

les benzimidazoles vis-à-vis desquels 65 % des élevages ovins présentaient une résistance (Gopal *et al.*, 1999 ; Sutherland *et al.*, 2002 ; Loveridge *et al.*, 2003). Chez les bovins, une résistance à l'ivermectine a été rapportée concernant *Cooperia spp.* (Vermunt *et al.*, 1995). En Asie, les cas rapportés ne sont pas nombreux et se rapportent aux benzimidazoles, au lévamisole, au morantel et à l'ivermectine (Gill, 1996).

En Amérique du Nord, quelques cas sont rapportés et concernent aussi les principaux antihelminthiques (Uhlinger *et al.*, 1992). Par contre, les études ont été plus nombreuses en Amérique du Sud où le phénomène semble plus inquiétant du fait du grand nombre des cas et de la diversité des molécules concernées (Echevarria *et al.*, 1996 ; Maciel *et al.*, 1996 ; Ademola, 2002).

En Afrique, les principales classes pharmaceutiques déjà citées sont concernées et ce dans de nombreux pays, mais les publications officielles font défaut. Néanmoins, plusieurs cas ont été rapportés au Nigéria, en Zambie, au Mozambique, au Kenya et aussi en Afrique du Sud (Van Wyk, 1990 ; Mwamachi *et al.*, 1995 ; Gabrie *et al.*, 2001 ; Atanasio *et al.*, 2002 ; Fashanu et Fagbemi, 2003).

La situation en Europe est d'autant moins précise que les données manquent pour plusieurs pays de l'Union. Cependant, de nombreuses études ont porté sur le sujet dans des pays comme la France (Cabaret *et al.*, 1995 ; Chartier *et al.*, 1998 ; Silvestre *et al.*, 2002), la Belgique (Geerts, 1995), le Danemark (Maingi *et al.*, 1996), la Suisse (Schnyder *et al.*, 2005), l'Angleterre (Coles et Roush, 1992 ; Coles, 2003), l'Ecosse (Bartley *et al.*, 2004) et l'Espagne (Requejo-Fernández *et al.*, 1997). En général dans les pays de la Communauté européenne, le taux de résistance augmente au cours de ces dernières années, elle apparaît chez des parasites affectant plusieurs espèces et concerne la quasi totalité des molécules chimiques antihelminthiques (Sangster, 1999).

8.2. Effets des résidus d'antihelminthiques sur l'environnement

La fertilisation des pâturages est en partie assurée par l'action conjointe de nombreux invertébrés et de microorganismes aptes à dégrader la matière organique. Ces organismes décomposent les déjections animales entraînant ainsi l'enrichissement des sols.

Rappelons que les antiparasitaires sont constitués de molécules toxiques, et en fonction de la toxicité résiduelle de la molécule mère, de ses métabolites et des voies d'excrétion, des résidus se retrouvent libérés dans l'environnement. Cependant, tous les antihelminthiques ne présentent pas le même niveau de toxicité. Les effets les plus nocifs ont été observés pour les molécules tels que la phénothiazine, le coumaphos, le ruélène, la pipérazine et le dichlorvos (Blume *et al.*, 1976 ; Lumaret et Errouissi, 1986). La nouvelle famille des antihelminthiques, les lactones macrocycliques (avermectines, milbémycines), a certes révolutionné le marché des antiparasitaires en agissant sur les parasites internes et externes, présentant ainsi un large spectre. Elles possèdent néanmoins une plus grande persistance dans l'organisme (action systémique) et donc dans les déjections, ce qui amplifie leurs effets négatifs sur l'environnement. Une étude détaillée de Errouissi et collaborateurs (2001) concernant l'impact des résidus de l'ivermectine (utilisé sous forme de bolus chez les bovins) sur le coléoptère *Aphodius constans*, révèle que le pic de résidus dans les fèces est atteint au 63^e jour, et que jusqu'au 143^e jour la dose retrouvée reste létale pour ce coléoptère. Ainsi, les résidus peuvent faire disparaître ou interrompre la chaîne des décomposeurs et modifier le bon fonctionnement de l'écosystème ; c'est surtout le cas pour les coléoptères et les diptères coprophages (Lumaret, 2002). La réduction ou la disparition de ces êtres vivants non cibles provoque l'augmentation du temps de minéralisation des bouses, réduisant ainsi considérablement les surfaces pâturables, entraînant indirectement des dépenses supplémentaires en engrais

(la valeur économique des bousiers est estimée à 2 milliards de dollars par an pour la totalité du secteur agricole aux USA, selon Fincher en 1981).

CONCLUSION

Les protéases aspartiques gastriques des bovins sont présentes sous de multiples formes et montrent quelques caractéristiques communes surtout au niveau de leur structure et de leurs mécanismes d'activation. L'étude biochimique de ces enzymes protéolytiques a révélé très tôt leur intérêt en médecine vétérinaire, intérêt qui va en grandissant vu les difficultés actuelles rencontrées dans la gestion de certaines pathologies en l'occurrence les helminthoses gastriques des ruminants et la résistance des vers face aux drogues antiparasitaires qui, elles mêmes, lorsqu'elles sont utilisées abusivement, ont des effets négatifs sur l'environnement. A l'heure actuelle, le moyen le plus accessible (« mais non suffisant ») de lutter contre les endoparasites des bovins et leurs résistances face aux médicaments reste l'utilisation raisonnée des antiparasitaires associée à un système de rotation des pâturages adéquats. Chez les bovins, les travaux sur le pepsinogène ne sont pas aussi avancés que chez l'homme où on a vu se développer des méthodes de dosages immunologiques spécifiques.

Le dosage radioimmunologique du pepsinogène sanguin semble pourtant être un moyen efficace et non invasif de contrôle de ces parasitoses. C'est un moyen de diagnostic assez précoce par rapport à la coproscopie ou au bilan parasitaire, qui permettrait de suivre l'évolution des lésions gastriques, de diagnostiquer avec précision les groupes d'animaux malades, de diminuer considérablement le nombre de traitements systématiques et *in fine* de mieux gérer l'émergence de la résistance des parasites face aux antihelminthiques et aussi de diminuer les risques pour l'environnement.

A l'issue de cette revue, il apparaît opportun de développer des moyens de mesure spécifiques, efficaces et facilement accessibles permettant d'améliorer la gestion de nos systèmes d'élevage, comme l'a clairement exprimé Arthur Le Feuvre : « *If you can't or don't measure something, you can't manage it. If you can't manage it, then you can't control it* » (Van Wyk et Krecek, 2002). Le dosage radioimmunologique du pepsinogène devrait être intégré dans les plans de gestion. Chez les bovins, le dosage simultané d'au moins deux types de zymogènes apportera plus d'indications comme cela a été prouvé dans les études chez l'homme. D'où la nécessité de développer des outils diagnostiques utilisables dans l'espèce bovine et de soutenir la recherche dans ce sens.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les Dr J. Sulon, Dr N.M Sousa et Mme Raja Fares-Noucairi, pour leur collaboration.

BOVINE PEPSINOGEN AND PROCHYMOSIN : CURRENT KNOWLEDGE, APPLICATIONS AND OUTLINES IN THE MANAGEMENT OF GASTRO-INTESTINAL WORMS.

SUMMARY

The characterization of the gastric aspartic proteases and the understanding of their mechanisms of activation led to several applications in many domains as the use of chymosin in cheese industries and the diagnostic of gastric diseases in humans and animals. Particularly, in cattle, the indirect measurement of pepsinogen activity is largely used for the diagnosis of ostertagiosis.

Today, the gastric strongyloses are responsible for serious problems of management or the emergence

of parasites resistance towards anthelmintics, and no immediate solution is available. Nevertheless, several tracks are proposed such as a more rational use of anthelmintics by the study of blood pepsinogen. This approach held our attention.

The present review describes bovine pepsinogen and prochymosin, with an accent on the zymogen structure, their mechanisms of activation and the methods of blood levels measurement. The manuscript will end on the importance of the problems raised by gastric worms, and on the interest of the measurement of blood pepsinogen in the management of these diseases in cattle.

RÉFÉRENCES

- ADEMOLA I.O. A survey on ivermectin resistance in strongyles of sheep in oyo state Nigeria using a larval development assay. [en ligne] (2002) Adresse URL : http://www.isrvma.org/article/57_4_4.htm Consulté le 11/07/05.
- AL-JANABI J., HARTSUCK J.A., TANG J. Kinetics and mechanism of pepsinogen activation. *J. Biol. Chem.*, 1972, **247**, 4628-4632.
- ANDERSON N., ARMOUR J., JARRETT W.F.H., JENNINGS F.W., RITCHIE J.S.D., URQUHART G.M. A field study of parasitic gastroenteritis in cattle. *Vet. Rec.*, 1965, **77**, 1196-1204.
- ANDERSON N., ARMOUR J., ROSALIND M. EADIE, JARRETT W.F.H., JENNINGS F.W., RITCHIE J.S.D., URQUHART G.M. Experimental *Ostertagia ostertagi* infection in calves : results of single infection with five graded dose levels of larvae. *Am. J. Vet. Res.*, 1966, **27**, 1259-1265.
- ANDREN A. Production of prochymosin, pepsinogen and progastricsin, and their cellular and intracellular localization in bovine abomasal mucosa. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 1992, **210**, 59-64.
- ANDREN A., BJORCK L. Milk-feeding maintains the prochymosin production in cells of bovine abomasal mucosa. *Acta Physiol. Scand.*, 1986, **126**, 419-427.
- ANDREN A., BJORCK L., CLAESSEON O. Quantification of chymosin (rennin) and pepsin in bovine abomasa by rocket immuno-electrophoresis. *Swed. J. Agric. Res.*, 1980, **10**, 1323-1330.
- ANDREN A., BJORCK L., CLAESSEON O. Immunohistochemical studies on the development of prochymosin and pepsinogen-containing cells in bovine abomasal mucosa. *J. Physiol.*, 1982, **327**, 247-254.
- ANSON M.L., MIRSKY A.E. The estimation of pepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 1932, **16**, 59-63.
- ANTONINI J., RIBADEAU-DUMAS B. Isolation, purification and properties of 2 bovine gastric zymogens : properties of the corresponding proteases. *Biochimie*, 1971, **53**, 321-329.
- ARMOUR J., BAIRDEN K., DUNCAN J.L., JENNINGS F.W., PARKINS J.J. Observations on ostertagiosis in young cattle over two grazing seasons with special reference to plasma pepsinogen levels. *Vet. Rec.*, 1979, **105**, 500-503.
- ATANASIO A., BOOMKER J., SITO C. A survey on the occurrence of resistance to anthelmintics of gastro-intestinal nematodes of goats in Mozambique. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 2002, **69**, 215-220.
- BANGA-MBOKO H., SULON J., CLOSSET J., REMY B., YOUSSEF I., DE SOUSA N.M., EL AMIRI B., SANGILD P.T., MAES D., BECKERS J.F. An improved radioimmunoassay for measurement of pepsinogen in porcine blood samples. *Vet. J.*, 2003, **165**, 288-295.

- BARTLEY D.J., JACKSON F., JACKSON E., SARGISON N. Characterisation of two triple resistant field isolates of *Teladorsagia* from Scottish lowland sheep farms. *Vet. Parasitol.*, 2004, **123**, 189–199.
- BATEMAN K. S., CHERNAIA M. M., TARASOVA N. I., JAMES M. N. G. Crystal structure of human pepsinogen A. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1998, **436**, 259–263.
- BAUDYS M., KOSTKA V. Covalent structure of chicken pepsinogen. *Eur. J. Biochem.*, 1983, **136**, 89–99.
- BEPPU T. The cloning and expression of chymosin (rennin) genes in microorganisms. *Trends Biotechnol.*, 1983, **1**, 85–89.
- BERGHEN P., DORNY P., VERCURYSSE J. Evaluation of a simplified blood pepsinogen assay. *Am. J. Vet. Res.*, 1987, **48**, 664–669.
- BERMEJOF, BOIXEDAD, GISBERT J.P., SANZ J.M., DEFARGES V., ALVAREZ CALATAYUD G., MORENO L., MARTIN DE ARGILA C. Basal concentrations of gastrin and pepsinogen I and II in gastric ulcer: influence of *Helicobacter pylori* infection and usefulness in the control of the eradication. *Gastroenterol. Hepatol.*, 2001, **24**, 56–62.
- BEUGNET F., KERBOEUF D. La résistance aux antiparasitaires chez les parasites des ruminants. *Point Vét.*, 1997, **28**: n° spécial, 167–174.
- BIEMOND I., JANSSEN J.B., CROBACH L.F., KREUNING J., LAMERSC.B. Radioimmunoassay of human pepsinogen A and pepsinogen C. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1989, **27**, 19–25.
- BLUME R.R., YOUNGER R.L., AGA A., MYERS C.J. Effects of residues of certain anthelmintics in bovine manure on *Onthophagus gazella*, a non-target organism. *Southwest. Entomol.*, 1976, **1**, 100–103.
- CABARET J., BAUDET H.M., DEVOS J., HUBERT J., CORTET J., SAUVE C. Studies on multispecific resistance of gastro-intestinal nematodes to benzimidazoles on dairy-goat farms. *Vet. Parasitol.*, 1995, **60**, 331–337.
- CHARTIER C., PORS I., HUBERT J., ROCHETEAU D., BENOIT C., BERNARD N. Prevalence of anthelmintic resistant nematodes in sheep and goats in Western France. *Small Rum. Res.*, 1998, **29**, 33–41.
- CHOW R.B., KASSELL B. Bovine pepsinogen and pepsin: I. Isolation, purification, and some properties of the pepsinogen. *J. Biol. Chem.*, 1968, **243**, 1718–1724.
- COLES G. Anthelmintic resistance in the UK. *Turning the Worm*, 2003, **11**, 1–3.
- COLES G.C., ROUSH R.T. Slowing the spread of anthelmintic resistant nematodes of sheep and goats in the UK. *Vet. Rec.* 1992, **130**, 505–510.
- CONDER G.A., CAMPBELL W.C. Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance with special reference to drug resistance. *Adv. Parasitol.*, 1995, **35**, 82–84.
- DANGOLLA A., BJORN H., NANSEN P. A study on the transmission of *Oesophagostomum dentatum* and *Hyostrogylus rubidus* among outdoor reared pigs in Denmark. *Acta Vet. Scand.*, 1994, **35**, 409–416.
- DANLEY D.E., GOEGHEGAN K.F. Structure and mechanism of formation of chymosin C derived from recombinant chymosin A. *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**, 9785–9789.
- DIMANDER S.O., HOGLUND J., SPORNDLY E., WALLER P.J. The impact of internal parasites on the productivity of young cattle organically reared on semi-natural pasture in Sweden. *Vet. Parasitol.*, 2000, **90**, 271–284.
- DORNY P., VERCURYSSE J. Evaluation of a micro method for the routine determination of serum pepsinogen in cattle. *Res. Vet. Sci.*, 1998, **65**, 259–262.
- DORNY P., SHAWA D.J., VERCURYSSE J. The determination at housing of exposure to gastro-intestinal nematode infections in first-grazing season calves. *Vet. Parasitol.*, 1999, **80**, 325–340.
- DRUDGE J.H., LELAND S.E.Jr., WYANT Z.N. Strain variation in the response of sheep nematodes to the action of phenothiazine: II. studies on pure infections of *Haemonchus contortus*. *Am. J. Vet. Res.* 1957, **18**, 317–325.
- DRUDGE J.H., ELAM G. Preliminary observations on the resistance of horse strongyles to phenothiazine. *J. Parasitol.* 1961, **47**, 38–39.
- ECHEVARRIA F., BORBA M.F., PINHEIRO A.C., WALLER P.J., HANSEN J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: Brazil. *Vet. Parasitol.* 1996, **62**, 199–206.
- ECKERSALL P.D., MACASKILL J., MCKELLAR Q.A., BRYCE K.L. Multiple forms of bovine pepsinogen: isolation and identification in serum from calves with oostagiasis. *Res. Vet. Sc.*, 1987, **43**, 279–283.
- EDWARDS K., JEPSON R.P., WOOD K.F. Value of plasma pepsinogen estimation. *Br. Med. J.*, 1960, **5165**, 30–32.
- EMTAGE J.S., ANGAL S., DOEL M.T., HARRIS T.J.R., JENKINS B., LILLEY G., LOWE P.A. Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli* (synthetic oligonucleotide/gene expression/industrial enzyme). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1983, **80**, 3671–3675.
- ENIGHT K., DEY-HAZRAA., FEDER H. Influence of *Hyostrogylus* infection on plasma pepsinogen content and electrolyte concentration of gastric juice in the pig. *Zentralbl. Veterinarmed. A*, 1972, **19**, 416–425.
- ERROUSSI F., ALVINERIE M., GALTIER P., KERBOEUF D., LUMARET J.P. The negative effects of the residues of ivermectin in cattle dung using a sustained-release bolus on *Aphodius constans* (Duft.) (Coleoptera: Aphodiidae). *Vet. Res.*, 2001, **32**, 421–427.
- FASHANU S.O., FAGBEMI B.O. A preliminary investigation of resistance to anthelmintics in strongyles of cattle in Shaki, Nigeria. *Afr. J. Biomed. Res.*, 2003, **6**, 111–112.

- FINCHER G.T. The potential value of dung beetles in pasture ecosystems. *J. Georgia Entomol. Soc.*, 1981, **16**, 316-333.
- FOLTMANN B. Gastric proteinases-structure, function, evolution and mechanism of action. *Essays Biochem.*, 1981, **17**, 52-84.
- FOLTMANN B., PEDERSEN V.B., JACOBSEN H., KAUFFMANT D., WYBRANDTF G. The complete amino acid sequence of prochymosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, **74**, 2321-2324.
- FOLTMANN B., JENSEN A.L., LOENBLAD P., SMIDT E., AXWLSN N.H. A developmental analysis of the production of chymosin and pepsin in pigs. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1981, **68B**, 9-13.
- FOLTMANN B., DROHSE H.B., NIELSEN P.K., JAMES M.N. Separation of porcine pepsinogen A and progastricsin. Sequencing of the first 73 amino acid residues in progastricsin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, **1121**, 75-82.
- FURIHATA C., SAITO D., FUJIKI H., KANAI Y., MATSUSHIMA T., SUGIMURA T. Purification and characterization of pepsinogens and a unique pepsin from rat stomach. *Eur. J. Biochem.*, 1980, **105**, 43-50.
- GABRIE S., PHIRI I.K., DORNY P., VERCURYSSE J. A survey on anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Lusaka, Zambia. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 2001, **68**, 271-274.
- GARNOT P., VALLES E., THAPON J.L., TOULLECR., TOMASSONE R., RIBADEAU-DUMAS B. Influence of dietary proteins on rennin and pepsin content of pre-ruminant calf vell. *J. Dairy Res.*, 1974, **41**, 19-23.
- GARNOT P., TOULEC R., THAPON J.L., MARTIN P., HOANG M.T., MATHIEU C.M., RIBADEAU-DUMAS B. Influence of age, dietary protein and weaning on calf abomasal enzymic secretion. *J. Dairy Res.*, 1977, **44**, 9-23.
- GEERTS S. Anthelmintics resistance in gastro-intestinal nematodes in domestic animals. *Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.*, 1995, **57**, 351-370.
- GILL B.S. Anthelmintic resistance in India. *Vet. Parasitol.*, 1996, **63**, 173-176.
- GOFF C.G., MOIR D.T., KOHNO T., GRAVIUS T.C., SMITH R.A., YAMASAKI E., TAUNTON-RIGBY A. Expression of calf prochymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1984, **27**, 35-46.
- GOMES M.A., LIMA W., DOS S., PESQUERO J.L. A new method for bovine pepsinogen purification : preparation of a specific antibody. *J. Immunoassay*, 1994, **15**, 157-170.
- GOPAL R.M., POMROY W.E., WEST D.M. Resistance of field isolates of *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* to ivermectin. *Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 781-786.
- GUILLOTEAU P., DELANSORNE R., TOULLEC R. Répartition des concentrations enzymatiques dans la muqueuse abomasale du veau pré-ruminant : évolution avec l'âge. *Reprod. Nutr. Dev.*, 1982, **22**, 511-522.
- GUILLOTEAU P., CORRIG T., GARNOT P., MARTIN P., TOULLEC R., DURANT G. Effect of age and weaning on enzyme activities of abomasums and pancreas of the lamb. *J. Dairy Sci.*, 1983, **66**, 2373-2385.
- GUILLOTEAU P., CORRIG T., TOULLEC R., ROBELIN J. Enzyme potentialities of the abomasum and pancreas of the calf : I. effect of age in the pre-ruminant. *Reprod. Nutr. Dev.*, 1984, **24**, 315-325.
- GUILLOTEAU P., CORRIG T., TOULLEC R., GUILHERMET R. Enzyme potentialities of the abomasum and pancreas of the calf: II. effects of weaning and feeding a liquid supplement to ruminant animals. *Reprod. Nutr. Dev.*, 1985, **25**, 481-493.
- HANSKY J. Clinical aspects of gastrin physiology. *Med. Clin. North Am.*, 1974, **58**, 1217-1230.
- HARBOE M., ANDERSEN P.M., FOLTMANN B. The activation of bovine pepsinogen sequence of the peptides released, identification of a pepsin inhibitor. *J. Biol. Chem.* 1974, **249**, 4487-4494.
- HARBOE M.K., FOLTMANN B. Bovine pepsin: the sequence of the first 65 amino acid residues (completing the sequence of the first 110 residues of bovine pepsinogen). *FEBS Lett.*, 1975, **60**, 133.
- HARKKI A., UUSITALO J., BAILEY M., PENTILLA M., KNOWLES J.K.C. A novel fungal expression system : secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bio-Technol.*, 1989, **7**, 596-600.
- HARTSUCK J.A., MARCINISZYN J., HUANG J.S., TANG J. Intramolecular activation of pepsinogen. *Adv. Exp. Med Biol.*, 1977, **95**, 85-102.
- HARTSUCK J.A., KOELSCH G., REMINGTON S.J. The high-resolution crystal structure of porcine pepsinogen. *Proteins*, 1992, **13**, 1-25.
- HARVEY-WHITE J.D., SMITH J.P., PARBUONI E., ALLEN E.H. Reference serum pepsinogen concentrations in dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 1983, **44**, 115-117.
- HAYANO T., SOGAWA K., ICHIHARA Y., FUJII-FURIYAMA Y., TAKAHASHI Y. Primary structure of human pepsinogen C gene. *J Biol Chem.*, 1988, **263**, 1382-1385.
- HERRIOTT R.M. Isolation, crystallization, and properties of swine pepsinogen. *J. Gen. Physiol.*, 1938, **21**, 501-540.
- HILDERSON H., BERGHEN P., VERCURYSSE J., DORNY P., BRAEN L. Diagnostic value of pepsinogen for clinical ostertagiosis. *Vet. Rec.*, 1989, **125**, 376-377.
- HIRASAWA A., ATHAUDA S.B.P., TAKAHASHI K. Purification and characterization of turtle pepsinogen and pepsin. *J. Biochem.*, 1996, **120**, 407-414.
- HOUEN G., MADSEN M.T., HARLOW K.W., LONBLAD P., FOLTMANN B. The primary structure and enzymic properties of porcine prochymosin and chymosin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1996, **28**, 667-675.
- ICHIHARA Y., SOGAWA K., MOROHASHI K., FUJII-KURIYAMA Y., TAKAHASHI K. Nucleotide sequence of a nearly full-length cDNA coding for pepsinogen of rat gastric mucosa. *Eur. J. Biochem.*, 1986, **161**, 7-12.
- ICHINOSE M., MIKI K., FURIHATA C., KAGEYAMA T., NIWA H., OKA H., MASUSHIMA T., TAKAHASHI K. Radioimmunoassay of serum

- group I and group II pepsinogens in normal controls and patients with disorders. *Clin. Chim. Acta*, 1982, **126**, 183–191.
- ISHIHARA T., ICHIHARA Y., HAYANO T., KATSURA I., SOGAWA K., FUJII-KURIYAMA Y., TAKAHASHI K. Primary structure and transcriptional regulation of rat pepsinogen C gene. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 10193–10199.
- JAMES M.N.G., SIELECKI A.R. Molecular structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1.8 Å resolution. *Nature*, 1986, **319**, 33–38.
- JANOWITZ H.D., HOLLANDER F.I. The basal secretion of pepsin by the human stomach. *J. Clin. Invest.*, 1952, **31**, 338–340.
- JENNINGS F.W., ARMOUR J., LAWSON D.D., ROBERTS R. Experimental *Ostertagia ostertagi* infection in calves: studies with abomasal cannulas. *Am. J. Vet. Res.*, 1966, **27**, 1249–1257.
- KAGEYAMA T., TAKAHASHI K. Isolation of an activation intermediate and determination of the amino acid sequence of the activation segment of human pepsinogen A. *J. Biochem.*, 1980, **88**, 571–582.
- KAGEYAMA T., TAKAHASHI K. Rabbit pepsinogens: purification, characterization, analysis of the conversion process to pepsin and determination of the NH₂-terminal amino-acid sequences. *Eur. J. Biochem.*, 1984, **141**, 261–269.
- KAGEYAMA T., TANABE K., KOIWAI O. Structure and development of rabbit pepsinogens: stage-specific zymogens, nucleotide sequences of cDNAs, molecular evolution, and gene expression during development. *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**, 17031–17038.
- KAGEYAMA T., TANABE K., KOIWAI O. Development dependent expression of isozymogens of monkey pepsinogens and structural differences between them. *Eur. J. Biochem.*, 1991, **202**, 205–215.
- KAGEYAMA T., ICHINOSE M., TSUKADA S., MIKI K., KUROKAWA K., KOIWAI O. Gastric procathepsin E and progastricsin from guinea pig: purification, molecular cloning of cDNAs, and characterization of enzymatic properties, with special reference to procathepsin E. *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 16450–16459.
- KERBOEUF D. Le dosage de pepsinogène sanguin, élément de diagnostic dans les strongyloses gastriques des ruminants. *Rev. Méd. Vét.*, 1979, **130**, 1365–1370.
- KERBOEUF D., KOCK C., LE DREAN E., LACOURT A. Méthode simplifiée de la mesure de concentration en pepsinogène dans le sérum. *Rev. Méd. Vét.*, 2002, **153**, 707–712.
- LANG H.M., KASELL B. Bovine pepsinogens and pepsins III: composition and specificity of the pepsins. *Biochemistry*, 1971, **10**, 2296–2301.
- LEWIN M., BONFILS S. Statistic evaluation of the correlation of acid-pepsin (K25) in human gastric juice in health and disease. *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol.*, 1968, **13**, 780–791.
- LIN X.L., WONG R.N., TANG J. Synthesis, purification, and active site mutagenesis of recombinant porcine pepsinogen. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 4482–4489.
- LOVERIDGE B., McARTHUR M., MCKENNA P.B., MARIADASS B. Probable multigenic resistance to macrocyclic lactone anthelmintics in cattle in New Zealand. *N. Z. Vet. J.*, 2003, **51**, 139–141.
- LUMARET J.P. Toxicité de certains helminthocides vis-à-vis des insectes coprophages et conséquences sur la disparition des excréments de la surface du sol. *Acta Oecol.*, 1986, **7**, 313–324.
- LUMARET J.P., ERROUSSI F. Use of anthelmintics in herbivores and evaluation of risks for the non target fauna of pastures. *Vet. Res.*, 2002, **33**, 547–562.
- MACIEL S., GIMENEZ A.M., GAONA C., WALLER P.J., HANSEN J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: Paraguay. *Vet. Parasitol.*, 1996, **62**, 207–212.
- MAINGI N., BJORN H., THAMSBORG S.M., BOGH H.O., NANSEN P. A survey of anthelmintic resistance in nematode parasites of goats in Denmark. *Vet. Parasitol.*, 1996, **66**, 53–66.
- McKELLAR Q., DUNCAN J.L., ARMOUR J., McWILLIAM P.O. Response to transplanted adult *Ostertagia ostertagi* in calves. *Res. Vet. Sci.*, 1986, **40**, 367–371.
- MEITNER P.A., KASELL B. Bovine pepsinogens and pepsins: a series of zymogens and enzymes that differ in organic phosphate content. *Biochem. J.*, 1971, **121**, 249–256.
- MELLOR J., DOBSON M.J., ROBERTS N.A., TUIE M.F., EMTAGE J.S., WHITE S., LOWE P.A., PATEL T., KINGSMAN A.J., KINGSMAN S.M. Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1983, **24**, 1–14.
- MESARIC M., ZADNIK T., KLINKON M. Comparison of serum pepsinogen activity between enzootic bovine leucosis (EBL) positive beef cattle and cows with abomasal ulcers. *Slov. Vet. Res.*, 2002, **39**, 227–232.
- MIRSKY I.A., FUTTERMAN P., BROHKAHN R.H., KAPLAN S.M. Plasma pepsinogen activity as an index of gastric secretion in various clinical states. *J. Lab. Clin. Med.*, 1950, **36**, 967.
- M O H A N T Y A . K . , MUKHOPADHYAY U.K., GROVER S., BATISH V.K. Bovine chymosin: production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotech. Adv.*, 1999, **17**, 205–217.
- MOORE S.A., SIELECKI A.R., CHERNAIA M.M., TARASOVA N.I., JAMES M.N.G. Crystal and molecular structures of human progastricsin at 1.62 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 1995, **247**, 466–485.
- MORIYAMA A., KAGEYAMA T., TAKAHASHI K. Identification of monkey lung procathepsin D-II as a pepsinogen C-like acid protease zymogen. *Eur. J. Biochem.*, 1983, **132**, 687–692.
- MOSTOFA M., McKELLAR Q.A., ECKERSALL P.D. Comparison of pepsinogen forms in cattle, sheep and goats. *Res. Vet. Sci.*, 1990, **48**, 33–37.
- MUNOZ R., GARCIA J.L., CARRASCOSA A.V., GONZALEZ R. Cloning of the authentic bovine gene encoding pepsinogen A and its expression in microbial cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, **70**, 2588–2595.

- MURRAY M. Structural changes in bovine ostertagiasis associated with increased permeability of the bowel wall to macromolecules. *Gastroenterology*, 1969, **56**, 763-772.
- MWAMACHI D.M., AUDHO J.O., THORPE W., BAKER R.L. Evidence for multiple anthelmintic resistance in sheep and goats reared under the same management in coastal Kenya. *Vet. Parasitol.*, 1995, **60**, 303-313.
- NAGAMACHI Y., NAKAMURA T. Relationship between site of peptic ulceration and gastric acid-peptic activity : new evaluation of gastric analysis in patients with acute gastric bleeding and chronic peptic ulcer. *Gastroenterol. Jpn.*, 1978, **13**, 77-84.
- NAPPERT G., VRINS A., BEAUREGARD M., VERMETTE L., LARIVIERE N. Radioimmunoassay of serum pepsinogen in relation to gastric (pars oesophageal) ulceration in swine herds. *Can. J. Vet. Res.*, 1990, **54**, 390-393.
- NARITA Y., ODA S., TAKENAKA O., KAGEYAMA T. Phylogenetic position of Insectivora inferred from the cDNA sequences of pepsinogen A and C. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2001, **21**, 32-42.
- NIELSEN P.K., FOLTMANN B. Purification and characterization of porcine pepsinogen B and pepsin B. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, **322**, 417-422.
- PALSG., RASANENV., MEUWISSEN S.G., FRANTS R.R., KOSTENSE P.J., ERIKSSON A.W. Enzyme-linked immunosorbent assay and radioimmunoassay of serum pepsinogen A. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1987, **47**, 29-33.
- PEDERSEN V.B., FOLTMANN B. The amino acid sequence of a hitherto unobserved segment from porcine pepsinogen preceeding the N-terminus of pepsin. *FEBS Lett.*, 1973, **35**, 255-256.
- PLEBANI M. Pepsinogens in health and disease. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 1993, **30**, 273-328.
- RAO S., DUTTA S.M. Extraction of rennet from abomasum of suckling buffalo calves. *Ind. J. Dairy Sci.*, 1981, **34**, 235-237.
- READ M.A., CHICK P., HARDY K.J., SHULKES A. Ontogeny of gastrin, somatostatin, and the H⁺/K⁺-ATPase in the ovine fetus. *Endocrinology*, 1992, **130**, 1688-1697.
- REQUEJO-FERNÁNDEZ A.M., MEANA A., ROJO-VÁZQUEZ F.A., OSORO K., ORTEGA-MORA L.M. Anthelmintic resistance in nematode parasites from goats in Spain. *Vet. Parasitol.*, 1997, **73**, 83-88.
- RICHTER C., TANAKA T., YADA R.Y. Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases : pepsinogen, progastricsin and prochymosin. *Biochem. J.*, 1998, **335**, 481-490.
- SAMLOFF I.M. Peptic ulcer : the many proteinases of aggression. *Gastroenterology*, 1989, **96**, 586-595.
- SAMLOFF I.M., LIEBMAN W.M. Radioimmunoassays of group I pepsinogens in serum. *Gastroenterology*, 1974, **66**, 494-502.
- SANGILD P.T., FOWDEN A.L., TRAHAIR J.F. How does the foetal gastro-intestinal tract develop in preparation for enteral nutrition after birth ? *Livest. Prod. Sci.*, 2000, **66**, 141-150.
- SANGSTER N.C. Anthelmintic resistance : past, present and future. *Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 115-124.
- SANGSTER N.C. Managing parasitic resistance. *Vet. Parasitol.*, 2001, **98**, 89-109.
- SCHNYDER M., TORGERSON P.R., SCHONMANN M., KOHLER L., HERTZBERG H. Multiple anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* isolated from South African Boer goats in Switzerland. *Vet. Parasitol.*, 2005, **128**, 285-290.
- SHAW D.J., VERCRIJSSE J., CLAEREBOUT E., DORNY P. Gastro-intestinal nematode infections of first-grazing season calves in Western Europe : general patterns and the effect of chemoprophylaxis. *Vet. Parasitol.*, 1998, **75**, 115-131.
- SIDIKOU D.I., BANGA-MBOKO H., TAMBOURA H.H., HORNICK J.L., REMY B., BECKERS J.F. Correlation between a proteolytic method and a radioimmunoassay for porcine serum pepsinogen concentrations. *Res. Vet. Sc.*, 2006, **80**, 260-266.
- SIELECKI A.R., FUJINAGA M., READ R.J., JAMES M.N.G. Refined structure of porcine pepsinogen at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 1991, **219**, 671-692.
- SILVESTRE A., LEIGNEL V., BERRAG B., GASNIER N., HUMBERT J.-F., CHARTIER C., CABARET J. Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics : pro and cons among breeding management factors. *Vet. Res.*, 2002, **33**, 465-480.
- SOGAWA K., FUJII-KURIYAMA Y., MIZUKAMI Y., ICHIHARA Y., TAKAHASHI K. J. Primary structure of human pepsinogen gene. *Biol. Chem.*, 1983, **258**, 5306-5311.
- SUTHERLAND I.A., MOEN I.C., LEATHWICK D.M. Increased burdens of drug-resistant nematodes due to anthelmintic treatment. *Parasitology*, 2002, **125**, 375-381.
- SUZUKI M., NARITA Y., ODA S., MORIYAMA A., TAKENAKA O., KAGEYAMA T. Purification and characterization of goat pepsinogens and pepsins. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 1999, **122**, 453-460.
- SZECSI P.B. The aspartic proteases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1992, **52** : Suppl 210, 5-22.
- SZECSI P.B., HALGREEN H., POULSEN S.S., AXELSSON C.K., DAMKJAER-NIELSEN M., KJAER T., FOLTMANN B. Demonstration of pepsinogen C in human pancreatic islets. *Gut*, 1987, **28**, 1208-1214.
- SZECSI P.B., KOCH C., FOLTMANN B. Seminal pepsinogen C is not identical with, but is very similar to gastric pepsinogen C. *FEBS Lett.*, 1988, **238**, 101-104.
- THODE-JENSEN P. A simple method for determination of pepsinogen in bovine serum and plasma. *Acta Vet. Scand.*, 1977, **18**, 10-14.

- TSUCHIYA K., GOMI K., KITAMOTO K., KUMAGAI C., TAMURA G. Secretion of calf chymosin from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biot.*, 1993, **40**, 327-332.
- UHLINGER C., KRISTULA M. A field evaluation of three methods of administration of anthelmintics to horses. *Equine Vet. J.*, 1992, **24**, 487-488.
- VAN WYK J.A. Integrated worm control as a strategy in the control of gastro-intestinal nematodes of sheep and cattle. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 1990, **61**, 141-145.
- VAN WYK J.A., KRECEK R.C. Sustainable worm management : an electronic conference. [En ligne] (2002). Adresse URL : <http://www.worms.org.za/econf/manworm.doc> Consulté le 04/11/2005.
- VERCRUYSSSE J., CLAEREBOUT E. Treatment vs non-treatment of helminth infections in cattle: defining the threshold. *Vet. Parasitol.*, 2001, **98**, 195-214.
- VERMUNT J.J., WEST D.M., POMROY W.E. Multiple resistance to ivermectin and oxfendazole in *Cooperia* species of cattle in New Zealand. *Vet. Rec.*, 1995, **137**, 43-45.
- WAGNER S., HARUMA K., GLADZIWA U., SOUDAH B., GEBEL M., BLECK J., SCHMIDT H., MANNS M. *Helicobacter pylori* infection and serum pepsinogen A, pepsinogen C, and gastrin in gastritis and peptic ulcer : significance of inflammation and effect of bacterial eradication. *Am. J. Gastroenterol.*, 1994, **89**, 1211-1218.
- WALLER P.J. Anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.*, 1997, **72**, 391-412.
- XU R.J., CRANWELL P.D. Gastrin in foetal and neonatal pigs. *Comp Biochem Physiol B.* 1991, **98**, 615-621.
- YAKABE E., TANJI M., ICHINOSE M., GOTO S., MIKI K., KUROKAWA K. Purification, characterization, and amino acid sequences of pepsinogens and pepsins from the esophageal mucosa of bullfrog (*Rana catesbeiana*). *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 22436-22443.
- ZADNIK T., MESARIC M. Fecal blood levels and serum proenzyme pepsinogen activity of dairy cows with abomasal displacement. [en ligne] (1999) Adresse URL : http://www.isrvma.org/article/54_3_2.htm Consulté le 11/07/05.
- ZAMORA C.S., KOWALCZYK T., HOEKSTRA W.G., GRUMMER R.H., WILL J.A. Plasma concentrations of pepsinogen and corticosteroid in relation to gastric lesions in swine. *Am. J. Vet. Res.*, 1975, **36**, 1327-1329.
- ZINOVIEVA N., MULLER M., BREM G. Identification and characterization of multiple splicing forms of bovine prochymosin mRNA. *J. Dairy Sci.* 2002, **85**, 3476-3479.