

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

- Orientation :** Médecine vétérinaire
- Titre de la thèse en français :** Validation de l'haptoglobine sérique, marqueur de l'inflammation aiguë dans l'espèce bovine.
- Titre de la thèse en anglais :** Validation of serum haptoglobin, an acute phase protein, in cattle
- Candidat :** Marie-France Humblet
- Promoteur :** Professeur Jean-Marie Godeau
- Département et Service :** Département des Sciences fonctionnelles, Service de Biochimie
- Date de la défense publique :** le 16 novembre 2005
- Composition du Jury :**
- Membres extérieurs à la faculté :*
Mr le Professeur José Joaquin CERON MADRIGAL
(Université de Murcia, Espagne), Mr le Professeur Jean-Paul CHAPPELLE
(Faculté de Médecine, ULg)
- Membres internes à la faculté de Médecine vétérinaire :*
F. ROLLIN, J.-F. BECKERS, L. ISTASSE, J.-L. HORNICK, K. TOUATI.

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Dans l'espèce bovine, la mise en évidence précoce d'un phénomène inflammatoire aigu permettrait de limiter au maximum les pertes économiques liées aux pathologies rencontrées dans la médecine de tous les jours. En effet, ces dernières ne sont généralement détectées qu'en phase clinique. Dans ce but, l'haptoglobine est le candidat idéal car elle présente une augmentation précoce de ses concentrations sériques lors de phénomène inflammatoire aigu, généralement avant l'apparition des signes cliniques. La réponse de cette protéine a été étudiée dans diverses conditions afin de valider son utilisation en tant que marqueur de routine dans la mise en évidence précoce d'une inflammation aiguë.

Au cours d'une première approche, la réponse en haptoglobine a été étudiée

chez des veaux souffrant de maladie respiratoire et chez des vaches atteintes de mammites. Ces diverses études ont été réalisées dans le cadre d'une approche individuelle. Nous avons dans un premier temps comparé la réponse de l'haptoglobine et du fibrinogène, un autre marqueur protéique de l'inflammation aiguë utilisé dans l'espèce bovine depuis longtemps, chez des veaux en croissance souffrant de bronchopneumonie naturelle, et par la suite, lors d'infection expérimentale chez de très jeunes veaux. Cette comparaison avait pour but d'identifier lequel des deux marqueurs serait le plus adéquat pour une utilisation de routine. Dans une troisième étude, la réponse en haptoglobine a été observée chez trois groupes de veaux en croissance souffrant de bronchopneumonie naturelle et soumis à trois traitements légèrement différents. La dernière étude

portait sur l'évaluation de la réponse en haptoglobine chez des vaches laitières primipares dans le cadre de mammites expérimentales.

Dans le cadre de la deuxième approche, les études mises sur pied avaient pour but d'évaluer la capacité de l'haptoglobine à détecter l'inflammation aiguë chez des vaches laitières au cours du péripartum, étant donné qu'à cette période, la vache est susceptible de développer des pathologies en relation avec le vêlage. Les études réalisées dans cette deuxième partie du travail permettaient également d'envisager l'hypothèse d'une utilisation de l'haptoglobine en tant que marqueur de l'état de santé du troupeau. Dans un premier temps, l'approche était basique et reposait sur l'observation de signes cliniques visibles extérieurement : une comparaison a été réalisée entre la réponse en haptoglobine et en amyloïde

sérique A, une autre protéine de la phase aiguë, avec l'observation de pathologies chez les animaux suivis. Au cours d'un deuxième suivi, des examens cliniques approfondis ont été réalisés en parallèle aux dosages en haptoglobine afin de confirmer les observations faites dans l'étude précédente.

RÉSULTATS

La première partie de ce travail regroupe quatre études réalisées dans le cadre d'une approche individuelle.

La première étude a été réalisée chez des veaux en croissance souffrant de bronchopneumonie d'étable, chez lesquels un traitement anti-inflammatoire avait été administré ou non suivant le grade de sévérité des signes cliniques. L'haptoglobine sérique, le fibrinogène plasmatique ainsi que d'autres paramètres sanguins tels que les protéines avaient été dosés avant l'examen clinique, puis après guérison. Les veaux auxquels avait été administré un anti-inflammatoire avaient présenté des concentrations sériques en haptoglobine significativement plus élevées lorsqu'ils étaient malades que les animaux n'en ayant pas reçu. Cette observation confirmait la décision de non-traitement chez ces derniers. L'haptoglobine a confirmé plus de 75% des cas de décision de traitement anti-inflammatoire. Il pourrait donc être intéressant de se baser sur ses concentrations pour identifier les veaux nécessitant un traitement anti-inflammatoire.

Une deuxième étude réalisée chez des veaux d'une semaine infectés expérimentalement au moyen d'une souche de *Pasteurella haemolytica* a permis d'observer la cinétique de la réponse en haptoglobine et en fibrinogène, après traitement antibiotique. Les deux protéines ont présenté une augmentation de leurs concentrations. De manière

générale, l'haptoglobine a répondu de manière plus précoce et son augmentation était plus marquée que le fibrinogène. L'haptoglobine est revenue à des taux physiologiques après instauration du traitement.

La troisième étude a permis de comparer la réponse en haptoglobine chez trois groupes de veaux souffrant de bronchopneumonie mais soumis à trois traitements légèrement différents. Tous reçurent un antibiotique, de l'atropine et un anti-inflammatoire non-stéroïdien. Les animaux du groupe B reçurent une première injection de dexaméthasone et les veaux du groupe C reçurent un diurétique. Les valeurs sériques en haptoglobine ont diminué au fil des jours. Un effet dexaméthasone a été observé chez les veaux du groupe B qui avaient également présenté de l'inappétence ; les concentrations en haptoglobine ont augmenté au lendemain de l'injection. L'haptoglobine pourrait être considérée comme un marqueur d'efficacité de traitement.

La dernière étude a été réalisée chez des vaches laitières primipares inoculées expérimentalement en intra-mammaire avec *Escherichia coli*. Cette inoculation a été effectuée trois à quatre semaines après le vêlage. La cinétique de la réponse en haptoglobine a pu également être suivie. Une distinction entre deux catégories d'animaux s'imposait car un certain nombre d'entre eux présentaient déjà des valeurs en haptoglobine supérieures au seuil de décision médicale avant inoculation. Comme aucun examen gynécologique n'avait été pratiqué, ces taux élevés avant inoculation pouvaient être liées à la présence d'une infection utérine. Chez les autres vaches, les concentrations sériques en haptoglobine ont commencé à augmenter entre 15 et 18 heures post-inoculation, pour atteindre

un pic entre 48 et 72 heures post-inoculation.

La deuxième partie du travail aborde l'hypothèse d'une utilisation de l'haptoglobine en tant que marqueur de l'état de santé du troupeau.

La première étude a été réalisée chez des vaches laitières à différents stades physiologiques, dont les échantillons provenaient de quatre pays. Une comparaison a été effectuée entre le statut de gestation, caractérisé par le dosage de la *bovine pregnancy associated glycoprotein* (bPAG), et les concentrations en haptoglobine afin de vérifier l'hypothèse qu'un état de non-gestation était lié à la présence d'une inflammation aiguë. Aucun lien n'a pu être fait entre l'état de gestation et la prévalence en haptoglobine. Nous avons comparé l'haptoglobine au rapport albumine/globulines. Les échantillons présentant un rapport diminué avaient une concentration en haptoglobine signant l'inflammation aiguë.

La deuxième étude consistait en le suivi hebdomadaire ou bimensuel de vaches laitières. L'état de santé était attribué aux animaux sur base de l'observation des signes cliniques visibles. Les réponses en haptoglobine et en amyloïde sérique A (une autre protéine de l'inflammation aiguë) ont été comparées à l'observation de pathologies. Des augmentations significatives de l'haptoglobine et de l'amyloïde sérique A pendant la première semaine qui a suivi le vêlage ont été observées. Les deux protéines ont fait preuve d'une sensibilité médiocre dans la détection des animaux malades, probablement à cause du pourcentage élevé de métrites chroniques. Des prévalences légèrement supérieures à 10 % ont été observées parmi les échantillons des vaches saines, et ce pour les deux marqueurs. Par contre, ils ont mieux identifié les échantillons de vaches sai-

nes. Les deux protéines étaient bien en accord pour identifier l'absence ou la présence d'inflammation.

Les résultats ont été examinés plus attentivement entre la dernière semaine avant et la quatrième semaine après le vêlage chez les animaux en bonne santé. Du sang était prélevé une fois par semaine pour le dosage de l'haptoglobine et divers constituants sanguins. Une comparaison a été faite entre l'haptoglobine, les neutrophiles et les monocytes, autres marqueurs de l'inflammation. L'augmentation de l'haptoglobine dans la semaine qui suit le vêlage a été observée mais pas chez tous les animaux. L'haptoglobine et les globules blancs n'étaient pas du tout corrélés. Les neutrophiles ont présenté un pic au moment de la parturition. Quant aux monocytes, un pic était atteint dans la première semaine post-partum. Les autres paramètres mesurés ont permis d'identifier un profil de stress (maximal le jour du vêlage), un déficit énergétique et une balance azotée négative en post-partum.

Une dernière étude a été réalisée sur une période de 6 mois, au cours de laquelle quatre exploitations laitières ont été suivies de manière bimensuelle. Tous les animaux faisaient l'objet d'un examen clinique approfondi pour confirmer l'état de santé. L'haptoglobine et l'amyloïde sérique A ont été dosés. Les résultats obtenus étaient similaires à ceux de l'étude précédente : sensibilités faibles pour les deux marqueurs mais meilleures spécificités. L'accroissement de l'haptoglobine et de l'amyloïde sérique A a été observé dans la semaine du vêlage. Une prévalence d'environ 10 % a pu être observée pour les deux marqueurs parmi les échantillons provenant d'animaux en bonne santé. Plus de 95 % des échantillons provenant d'animaux en bonne santé n'avaient présenté aucune réponse en Hp ni en SAA. Par

contre, ils n'ont pu classer que 76 % des échantillons provenant d'animaux diagnostiqués malades.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les bovins d'élevage doivent être suivis régulièrement pour prévenir ou guérir les maladies parasitaires, bactériennes et virales dont ils peuvent être atteints. En général, le traitement n'est instauré qu'après l'apparition des signes cliniques. De plus, certaines affections ne sont pas traitées ou ne le sont que tardivement, car elles existent sous une forme sub-clinique qui atteint l'individu ou le troupeau entier et s'accompagne d'une chute des productions (croissance, viande, lait) non décelable immédiatement. Découvrir à temps l'apparition de ces maladies permettrait de les soigner précocement afin de réduire les chutes de production et d'améliorer l'issue du traitement. Le moyen d'y parvenir serait de disposer d'un marqueur non spécifique, c'est-à-dire un marqueur qui se manifesterait quelle que soit la cause des troubles et donc quelle que soit la pathologie impliquée. Il devrait également pouvoir être mis en évidence avant l'apparition des signes cliniques, et lors de pathologies sub-cliniques. Idéalement, il ne devrait jamais être présent chez les animaux en bonne santé, ou du moins se trouver dans des valeurs inférieures à celles définissant l'état de maladie.

Au cours de nos études successives, nous avons démontré que l'haptoglobine pouvait être considérée, dans l'espèce bovine, comme un excellent marqueur de l'inflammation aiguë, que ce soit lors d'infections naturelles, mais également expérimentales. L'haptoglobine a répondu positivement lors de pathologies respiratoires chez les veaux, lors de mammites expérimentales chez des vaches laitières primipares, et lors d'in-

fections utérines et articulaires aiguës chez des vaches laitières en post-partum. Le suivi de troupeaux laitiers a permis de mettre en évidence une augmentation physiologique des concentrations sériques de l'haptoglobine au moment du vêlage. Il est donc déconseillé de l'utiliser en tant que marqueur de l'inflammation pendant la première semaine après le vêlage, avec une grande variabilité individuelle. Cette réponse est généralement plus marquée chez les primipares que chez les multipares. En associant le dosage de l'haptoglobine à ceux préconisés pour la détection des maladies métaboliques survenant après le part, les animaux pourraient être suivis utilement afin d'intervenir rapidement pour prévenir et corriger les troubles dès leur apparition et avant toute possibilité de diagnostic clinique.

L'haptoglobine présente toutes les caractéristiques d'un marqueur idéal de l'inflammation aiguë. Ses concentrations chez les vaches et les veaux en bonne santé sont très basses voire indétectables, et elles peuvent présenter des augmentations très sévères (jusqu'à plus de mille fois leur taux physiologique) lors de pathologies inflammatoires aiguës, ce qui facilite la décision médicale. Ses taux sériques reviennent à la normale plus rapidement lorsque le traitement est efficace, mais restent par contre élevés si le traitement n'est pas efficace ou s'il n'est pas administré pendant un laps de temps suffisamment long. Et enfin, elle pourrait s'avérer intéressante pour la décision d'appliquer un traitement anti-inflammatoire, chez des veaux souffrant de bronchopneumonie par exemple.

Par rapport au fibrinogène, l'haptoglobine présente une réponse plus précoce, et revient à des niveaux physiologiques après un laps de temps plus court, ce qui permet notamment de vérifier rapidement l'efficacité d'un traitement.

Le dosage de l'haptoglobine présente également plusieurs avantages sur celui de l'amyloïde A sérique. Nous avons observé un plus grand nombre de faux positifs avec l'amyloïde A sérique. Bien que ce soit un marqueur plus précoce que l'haptoglobine, sa demi-vie est également beaucoup plus courte, il serait donc intéressant d'utiliser ces deux marqueurs en routine. Mais le dosage de l'amyloïde A sérique est de loin plus onéreux et plus lourd à mettre en œuvre que celui de l'haptoglobine ; le délai d'obtention des résultats est nettement plus long pour l'amyloïde A sérique que pour l'haptoglobine. A cause de ces différents aspects, le dosage de l'haptoglobine semble être mieux adapté à des analyses de routine. Le dosage de l'haptoglobine dans le lait est un pas de plus qui a été franchi

récemment par plusieurs équipes européennes. Les tests développés dans cette optique font appel à des techniques immunologiques parfois lourdes à mettre en œuvre, et surtout plus coûteuses, donc difficilement applicable dans un diagnostic de routine. Il serait intéressant de disposer d'un test, de type tigelette, qui pourrait permettre à l'éleveur de mettre en évidence la présence d'haptoglobine dans le lait au moment de la traite par exemple, ce qui faciliterait la détection précoce des phénomènes infectieux et inflammatoires se développant au niveau de la glande mammaire. Le screening de l'état de santé des animaux abattus pour la consommation humaine pourrait être amélioré par le dosage systématique de l'haptoglobine. De nouvelles approches de surveillance sanitaire doivent être envisagées

comme c'est déjà le cas chez le porc, en passant d'une médecine individuelle à une médecine de troupeau, afin de répartir les exploitations et non plus les individus. Pour cela, l'haptoglobine représente un outil approprié, à spectre suffisamment large et dont les limites de détection sont connues. La prévalence d'un tel marqueur étudiée à l'échelle d'un troupeau permettrait de connaître son état de santé dans le double but d'évaluer la qualité de son management et de déterminer la nécessité ou non d'une intervention médicale ; en effet, la tendance actuelle en médecine bovine est de pratiquer une médecine de troupeau. Dans cette optique, une étude à grande échelle est indiquée afin d'établir avec plus de précision le seuil de prévalence qui permettrait de classer les troupeaux en fonction de leur état de santé.

REFERENCES

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE:

- HUMBLET M.-F., COGHE J., ALVAREZ A., GODEAU J.M. Haptoglobin: a tool for prediction of treatment in growing calves suffering from bronchopneumonia. In : Proceedings of the 2nd European Colloquium on Animal Acute Phase Proteins, Bonn, 2001, p.8.
- HUMBLET M.-F., BOUTET P., LEKEUX P., GODEAU J.-M. Effects of dexamethasone and diuretic drugs on serum haptoglobin of calves suffering from severe bronchopneumonia in field conditions. In : Proceedings of the Xth Congress of the International Society of Animal Clinical Biochemistry, Gainesville, 2002, p.139.
- HUMBLET M.-F., JUDONG M., GODEAU J.-M. Relationship between haptoglobin, an acute phase protein, and absolute number of leukocytes, neutrophils and monocytes in lactating cows and in field conditions. In : Proceedings of the Xth Congress of the International Society of Animal Clinical Biochemistry, Gainesville, 2002, p.141.
- HUMBLET M.-F., COGHE J., LEKEUX P., GODEAU J.-M. Acute phase proteins assessment for an early selection of treatments in growing calves suffering from bronchopneumonia under field conditions. *Res. Vet. Sci.*, 2004, **77**, 41-47.
- HUMBLET M.-F., GUYOT H., BOUDRY B., MBAYAH F., HANZEN C., ROLLIN F., GODEAU J.-M. Relationship between haptoglobin, serum amyloid A and clinical status in the survey of dairy herds during a six months

REMERCIEMENTS

Les différentes études réalisées dans le cadre de ce travail ont été financées par le Ministère de l'Agriculture et des Classes Moyennes