

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

Orientation :	Médecine vétérinaire
Titre de la thèse en français :	Contribution à l'étude des protéases aspartiques gastriques des bovins: dosage plasmatique du pepsinogène A et de la chymosine B
Titre de la thèse en anglais :	Contribution on the study of bovine gastric aspartic proteases: measurement of plasmatic pepsinogen A and chymosin B
Candidat :	Djibo Idrissa Sidikou
Promoteur :	Prof. Jean-François Beckers
Co-promoteur :	Prof. Bertrand Losson
Département et Service :	Département des Sciences fonctionnelles - Secteur de Physiologie de la Reproduction animale
Date de la défense publique :	le 23 mars 2006
Composition du Jury :	<i>Membres extérieurs à la faculté :</i> D. Kerboeuf, P. Dorny <i>Membres internes à la faculté de Médecine vétérinaire :</i> J.-F. Beckers, B. Losson, P. Leroy, J.-L. Hornick

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Le dosage des protéases aspartiques ou de leur zymogène dans le sang périphérique présente un intérêt diagnostique évident. Chez l'homme, le test est fréquemment utilisé pour identifier ou distinguer diverses pathologies tels que les ulcères et les proliférations tumorales au niveau de l'estomac. Chez les animaux et principalement chez les herbivores, le test pratiqué sur le plasma permet de quantifier l'importance des verminoses en particulier celles à *Ostertagia* et *Hoemonchus* et d'apprécier la gravité des lésions de la muqueuse. Jusqu'il y a peu, chez les bovins, la seule méthode dont on disposait pour quantifier les protéases aspartiques était la méthode dite

enzymatique. Cette technique consiste à déterminer le niveau d'activité enzymatique des protéases acides sur un substrat ajouté en grande quantité par exemple l'albumine ou l'hémoglobine; et ensuite, les tyrosines libérées sont quantifiées par coloration au réactif de Folin Ciocalteus et lecture au spectrophotomètre. Pour évoquer cette méthode, les auteurs parlent de dosage du pepsinogène par la méthode enzymatique ou protéolytique.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux problèmes posés par ce type de dosage en comparant les résultats à ceux obtenus par radioimmunoassay. Ensuite, nous avons purifié le pepsinogène A bovin et développé son dosage radioimmunologique en parallèle avec celui de

la chymosine B. De grandes quantités d'antisérums sont disponibles pour la mise au point de dosages Elisa en sandwich.

La première étape du travail expérimental a eu pour objectif de comparer les résultats de la méthode enzymatique à ceux de la méthode radioimmunologique pour quantifier le pepsinogène dans le plasma du porc. L'étude a été menée sur un total de 123 échantillons prélevés sur des fœtus (n = 28), des adultes considérés comme sains (n = 56) et des animaux porteurs d'ulcères (n = 14) ou de parakératose (n = 25). Les deux méthodes ont été développées parallèlement en recherchant pour chacune les conditions optimales de traitement et de dilution des échantillons. Mesurées dans les deux

méthodes, les concentrations étaient sensiblement plus élevées ($P < 0.05$) chez les animaux avec parakératose ($1778 \pm 86,00$ mUTyr/L; $690 \pm 53,00$ ng/mL) et chez les porteurs d'ulcères ($2026 \pm 153,00$ mUTyr/L; $1747 \pm 94,00$ ng/mL) que chez les porcs sains ($935 \pm 58,00$ mUTyr/L; $275 \pm 35,00$ ng/mL).

Enfin, les résultats ont montré très clairement que dans la population de fœtus, la méthode radioimmunologique révélait de faibles concentrations de pepsinogène A ($2,5 \pm 5$ ng/mL) alors que la méthode enzymatique faisait état de niveaux assez élevés ($1150,71 \pm 82,00$ mUTyr/L), supérieurs à ceux relevés chez les adultes sains. Cette différence entre méthodes s'explique par le fait que la méthode RIA dose spécifiquement le pepsinogène A alors que la méthode enzymatique prend également en compte les autres protéases aspartiques en particulier la chymosine.

Cette étape fait apparaître clairement que la méthode radioimmunologique possède une meilleure aptitude à distinguer les groupes d'animaux en fonction de leur âge, et aussi les différents groupes cliniques entre eux. Cette partie de l'étude a permis une bonne maîtrise de la méthode enzymatique qui, a été très utile pour le suivi de la purification du pepsinogène bovin.

Dans la deuxième partie, développée en collaboration avec les départements de Chimie et Biochimie, le pepsinogène bovin a été purifié et caractérisé. Trois fractions désignées comme PgA-1, PgA-2 et PgA-3 ont été séparées à partir d'extraits de caillette bovine par chromatographie. La migration en gel d'électrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE) a montré un niveau élevé de pureté pour les fractions 1 et 2, dont le séquençage

a donné une extrémité NH₂-terminale identique : SVVKIPLVKK. Pour la fraction 3 qui présentait des impuretés, le séquençage a été réalisé après transfert sur PVDF, et les vingt cinq premiers acides aminés suivants ont été identifiés dans le séquençage NH₂-terminale: SVVKIPLVKKKSLRQN LIENGKLKE. La spectrométrie de masse a révélé pour le PgA-1 et PgA-2, des isoformes possédant différentes masses allant de 39.864 à 40.181 Da. Ces formes mineures ont été classées respectivement comme suit: PgA-1a, PgA-1b, PgA-1c, et PgA-2a, PgA-2b, PgA-2c. La composition en phosphate estimée est comprise entre 0,98 et 3,9 moles par mole de protéine. Les résultats suggèrent que les différences de masse entre les isoformes sont dues à des degrés différents de phosphorylation de la molécule. A l'issue de cette étude, le pepsinogène A bovin a été obtenu sous forme homogène non dénaturée et en quantités utilisables pour la production d'antisérums et le développement du dosage radiomunologique.

Dans la troisième partie, le dosage radioimmunologique homologue du pepsinogène A a été développé et validé. Le pepsinogène bovin précédemment purifié a été employé pour la production des antisérums spécifiques sur des lapins néo-zélandais suivant le protocole d'éthique n° 287. Trois antisérums avec des titres élevés ont été obtenus, et le meilleur sérum (R#822) a été utilisé dans le RIA à une dilution finale de 1/250.000. La limite de détection de l'analyse était de 20 ng/mL et le pourcentage de recouvrement s'étendait entre 85,5 % et 103,3 %. Le coefficient de variation intra-assay était inférieur à 6.6 %, tandis que la variabilité inter-assay était inférieure à 13.4 %. Le dosage du pepsinogène

a été utilisé chez six jeunes bovins de la naissance à quatre mois d'âge. La valeur moyenne du pepsinogène A (moyenne \pm DS) dans le plasma, était de $2070,6 \pm 752,1$ ng/mL à 1 jour après la naissance. La concentration a diminué progressivement et était d'environ $1196,3 \pm 306,8$ ng/mL à 21 jours, et $677,3 \pm 108,5$ ng/mL à 120 jours d'âge. Les taux de pepsinogène sanguins sont ainsi rapportés pour la première fois chez les bovins. D'autres investigations sont nécessaires afin de déterminer les valeurs de référence pour des animaux dans différentes conditions physiologiques et pathologiques ainsi que dans le cas de verminoses gastro-intestinales.

Dans la quatrième partie, le dosage radioimmunologique homologue de la chymosine B bovine a été développé et validé. La chymosine commerciale a été utilisée pour la production des antisérums spécifiques sur des lapins néo-zélandais suivant le protocole d'éthique n° 287. Quatre antisérums avec des titres élevés ont été obtenus et le meilleur sérum (R#817) a été utilisé dans le RIA à une dilution finale de 1/250.000. La limite de détection de l'analyse était de 9 ng/mL et le pourcentage de recouvrement s'étendait entre 89,3 % et 112,4 %. Le coefficient de variation intra-assay était compris entre 1,52 % et 5,23 %, tandis que la variabilité inter-assay était comprise entre 1,52 % to 12,57 %. En ce qui concerne la spécificité, aucune réaction croisée n'a été trouvée avec les autres membres de la famille des protéases aspartiques (pepsinogène A bovin, porcine et humaine). Les concentrations en chymosine ont été déterminées dans le plasma chez deux groupes de veaux (groupe 1: de la naissance à 24 heures, n = 10; groupe 2: du jour 1 au jour 21, n = 10). Une vache adulte

a été aussi prélevée dans les derniers jours de la gestation. Dans le groupe 1, les concentrations en chymosine étaient basses à la naissance (5 minutes après naissance), soit $47,3 \pm 45,1$ ng/mL et augmentent à $325,5 \pm 161,2$ ng/mL, 12 heures après naissance. Entre 12 et 24 heures, aucun changement significatif n'était observé et la moyenne était de $293,0 \pm 161,5$ ng/mL. Dans le deuxième groupe, on a observé une diminution constante du jour 1 au jour 21 d'âge. Un jour après la naissance, les valeurs étaient comprises entre 219,6 et 831,8 ng/mL (moyenne = 455,3 ng/mL), et à 21 jours, l'intervalle était de 31,5

à 261,7 ng/mL (moyenne = 117,9 ng/mL). Chez la vache adulte, on a observé une concentration moyenne relativement constante de $136 \pm 32,3$ ng/mL dans les derniers moments de gestation. L'utilisation du RIA démontre que la chymosine était présente en quantités mesurables chez le bovin.

Comparée aux méthodes RIA précédemment décrites chez les autres espèces, la validation des deux RIAs a montré des caractéristiques satisfaisantes et donc les techniques peuvent être simultanément utilisées pour l'évaluation du pepsinogène A et de la chymosine B chez les bovins.

