

## FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHÈSE

## Evaluation de l'utilisation du pepsinogène sanguin comme biomarqueur de l'intégrité de la muqueuse gastrique chez le porc.

### 2. Méthodes de dosage et intérêt en pathologie porcine

BANGA-MBOKO H.<sup>1,3</sup>, GODEAU J.M.<sup>2</sup>, DRION P.V.<sup>1</sup>, SIDIKOU I.D.<sup>1</sup>, REMY B.<sup>1</sup>, BECKERS J.F.<sup>1</sup>.

Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, 20 Bd Colonster, 4000 Sart-Tilman, Belgique.

1 Service de Physiologie de la Reproduction ;

2 Laboratoire de Biochimie ;

3 Institut de Développement Rural, Université Marien Ngouabi, B.P 69, Brazzaville, Congo-Brazzaville.

Correspondance : Jean-François BECKERS, tél : 32(0)4/366.41.61 ; fax : 32(0)4/366.41.65 ; email: jfbeckers@ulg.ac.be

**RESUME :** Le pepsinogène est une composante du suc gastrique qui participe à la digestion des protéines alimentaires. Il est aussi parmi les macromolécules qui entrent dans la circulation sanguine en faibles quantités mesurables chez des sujets normaux. Son dosage est utilisé dans la mise en évidence de certaines pathologies gastriques chez le porc. Cette synthèse décrit les méthodes de dosage et des valeurs sériques ou plasmatiques du pepsinogène en relation avec des ulcères ou les infestations parasitaires à *Hyostrongylus rubidus* chez le porc.

#### METHODES DE DOSAGE DU PEPSINOGENE SANGUIN

##### MÉTHODE PROTÉOLYTIQUE

L'estimation des concentrations sériques ou plasmatiques du pepsinogène est conventionnellement basée sur l'utilisation des méthodes protéolytiques. Plusieurs méthodes ont été proposées mais celle qui a obtenu une grande audience est basée sur l'estimation des peptides libérés pendant l'incubation du sérum avec une protéine de référence (albumine, hémoglobine, etc...) à pH acide (Anson et Mirsky, 1932; Mirsky *et al.*, 1952; Ryle et Porter, 1959; Bonfils *et al.*, 1967; Vagne *et al.*, 1967; Cheret et Bonfils, 1970; Lombarts et Peters, 1972).

La méthode protéolytique est une méthode indirecte de la mesure de la concentration du pepsinogène. Elle consiste en fait à mesurer l'activité enzymatique de la pepsine présente dans le sérum d'un échantillon dont on désire connaître la concentration en pepsinogène, sur une protéine de réf-

rence en milieu acide. Le principe de la méthode est résumé à la Figure 1.

Le substrat (c'est à dire la protéine de référence) doit être sensible à l'activité de l'enzyme, être facile à préparer, de conservation assez bonne et bon marché (Vatier *et al.*, 1968).

Chez le porc, jusqu'en 1990, les méthodes protéolytiques étaient la règle dans la détection des maladies gastriques comme les ulcères et les infections parasitaires à *H. rubidus* (Enight *et al.*, 1972; Titchener *et al.*, 1974; Zamora *et al.*, 1975; Dangolla *et al.*, 1994).

Chez les ruminants, le dosage du pepsinogène sanguin par la méthode protéolytique est utilisé depuis plus de 30 ans dans le diagnostic des parasitoses à *Ostertagia sp.* (Anderson *et al.*, 1965; Jennings *et al.*, 1966). Au cours de la première saison de pâture, des valeurs élevées de pepsinogène plasmatique coïncident avec l'apparition de cette parasitose gastro-intestinale. Différentes valeurs diagnostiques ont été rapportées dans des études cliniques chez les jeunes veaux infectés par *O. ostertagi*. Selon Anderson et

collaborateurs (1965), puis Berghen *et collaborateurs* (1993), des valeurs supérieures à 3500 mU tyrosine sont indicatives d'une infestation parasitaire à *Ostertagia* alors que Hilderson et collaborateurs (1989) fixent la limite à 5000 mU tyrosine. Il se pose ainsi un problème d'interprétation des résultats, l'absence d'une méthode standardisée entre laboratoires rendant la comparaison impossible.

Il est cependant indéniable que la méthode protéolytique est relativement cohérente pour les infections parasitaires de la caillette. Récemment, une méthode simple et moins coûteuse a été mise au point par Dorny et Vercruyse (1998) alliant la fiabilité et l'aspect économique.

Dans l'espèce humaine, les premières techniques de diagnostic par des méthodes protéolytiques ont été développées pour la première fois par Mirsky et collaborateurs (1952). Ces méthodes ont été largement utilisées pendant les années 60 (Bonfils *et al.*, 1967; Vagne *et al.*, 1967; Vatier *et al.*, 1968). Néanmoins, elles ont été fortement critiquées car jugées non

fiables. Le principal reproche est qu'elles mesuraient non seulement l'activité protéolytique des pepsines, mais aussi celles de toutes les autres protéases gastriques aspartiques présentes dans le sérum, d'où une surestimation des résultats (Samloff et Liebman, 1974). Ainsi dans les études précédentes, la concentration de pepsinogène chez les patients souffrant

d'une gastrectomie ou d'une anémie pernicieuse avait des valeurs plus élevées que chez des sujets normaux (Samloff *et al.*, 1975; Samloff *et al.*, 1976). Les confusions et les contradictions entre laboratoires ont poussé la plupart des laboratoires en médecine humaine à abandonner cette méthode en faveur des méthodes plus spécifiques (immunologiques).

## MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES

Les dosages immunologiques sont basés sur la capacité d'un antisérum à se lier spécifiquement à l'antigène et à un traceur (ou un marqueur approprié) permettant la mise en évidence de cette réaction.

Le traceur est souvent un isotope radioactif (le plus souvent l'iode 125) et le résultat est donné par la mesure de la radioactivité : c'est le dosage radioimmunologique, radioimmunoassay en anglais (RIA). Le traceur peut être aussi une enzyme qui mise en présence de son substrat, généralement un chromogène, libère une substance colorée, facile à mettre en évidence par mesure de la densité optique ou Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).

### Dosages radioimmunologiques

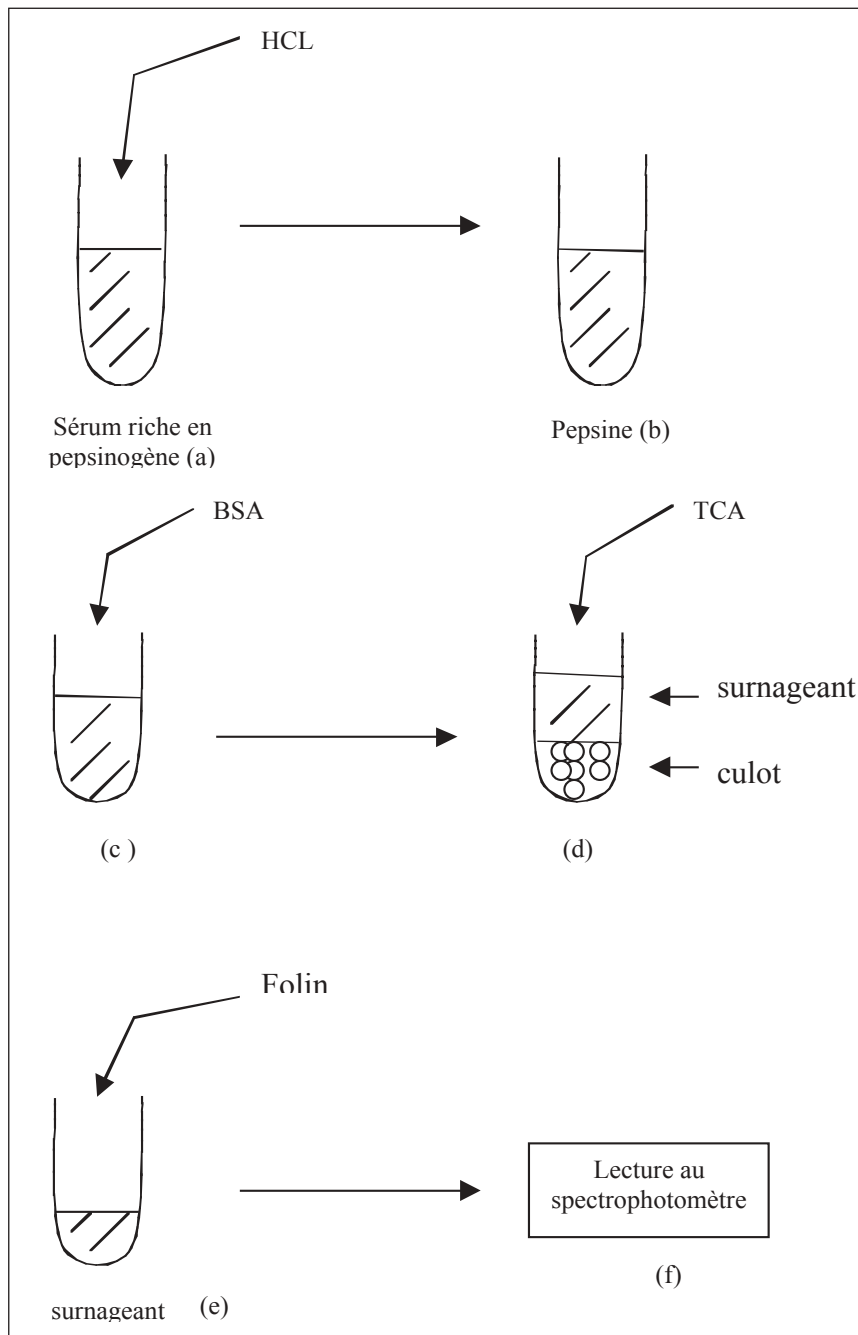
C'est une technique qui se doit d'être sensible, spécifique et précise pour doser des quantités infimes de substances biologiques comme le pepsinogène dans les liquides biologiques. Elle a été mise au point dans les années cinquante par les Américains Rosalyn Sussman Yalow (Prix Nobel de Physiologie en 1977) et Aaron Berson.

Son principe est basé sur la compétition entre l'antigène marqué par un isotope ( $Ag^*$ ) et l'antigène non marqué ( $Ag$ ) pour les anticorps spécifiques ( $AC$ ).



Les concentrations en  $Ag^*$  et en  $AC$  étant constantes, toute augmentation de la concentration en  $Ag$  entraîne une augmentation de la concentration en complexe  $Ag-Ac$  au détriment de la formation du complexe  $Ag^*-Ac$  et par conséquent une augmentation de la quantité d' $Ag^*$  libre dans le milieu d'incubation. Au terme de la réaction, les  $Ag^*$  libres et liés sont séparés. Grâce au signal émit par le marqueur, on peut mesurer la concentration en complexe  $Ag^*-Ac$  pour chaque concentration en  $Ag$ .

Dans la pratique, pour réaliser un dosage, on établit une courbe standard ou d'étalonnage avec des concentrations connues en pepsinogène grâce à laquelle on détermine la concentration en antigène de solutions inconnues (sérum ou plasma).



**Figure 1 :** Principe général du dosage du pepsinogène sanguin par la méthode protéolytique. Le pepsinogène contenu dans l'échantillon dont on désire connaître la concentration (a) est transformé en pepsine par l'acide chlorhydrique (b). La pepsine en contact d'un substrat protéique (ici l'albumine sérique bovine ; BSA) va provoquer la protéolyse de l'albumine (c). Les protéines non attaquées par la pepsine seront précipitées par l'acide trichloracétique (TCA) et formeront le culot (d). Le surnageant, contenant les acides aminés, est recueilli et coloré par le réactif de Folin-Ciocalteus qui est spécifique de la tyrosine(e). La densité optique est déterminée au spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 680 nanomètres. Les résultats sont exprimés en Unités (U) ou en milliunités (mU) tyrosine par litre de sérum/ 24 heures, en mg Tyrosine/mole ou encore en  $\mu$ mole/ litre de sérum.

Source : schéma reconstitué par les auteurs d'après la littérature.

La Figure 2 montre la décroissance du pourcentage du pepsinogène marqué qui se fixe à l'anticorps en fonction de quantités progressivement croissantes du pepsinogène non marqué. Le pepsinogène marqué déterminé dans des conditions identiques sur un échantillon inconnu (sérum ou plasma) permettra d'obtenir la concentration en pepsinogène dans l'échantillon.

#### Avantages de la méthode RIA:

Le RIA présente les avantages suivants:

- ◆ La spécificité: c'est-à-dire la capacité de mesurer un antigène particulier aux anticorps. La spécificité de la réaction immunologique est en rapport avec la pureté du pepsinogène marqué et de la spécificité de l'antisérum.
- ◆ La sensibilité: appelée aussi "limite de détection", c'est la possibilité de détecter les plus petites quantités de pepsinogène capable d'entraîner une décroissance dans la fixation du pepsinogène marqué. Elle varie avec le titre de l'antisérum utilisé. Par sa sensibilité, le RIA arrive à déterminer des concentrations qui s'expriment en nanogramme/ml ou picogramme/ml ou femtomole/litre.
- ◆ Précision: elle est déterminée par l'erreur point de la courbe et par l'erreur dosée sur un même échantillon analysé à plusieurs reprises pour une même manipulation.
- ◆ Application: le RIA est susceptible d'être utilisé en grandes séries de

dosages. Les échantillons n'ont pas besoin de subir un protocole particulier.

Le dosage radioimmunologique nécessite le matériel suivant: une préparation pure de pepsinogène, la même préparation marquée par un isotope radioactif selon la technique de Greenwood et collaborateurs (1963), un antisérum spécifique et une bonne technique de séparation du pepsinogène libre et du pepsinogène lié.

#### Le pepsinogène pur

Une préparation pure de pepsinogène, débarrassée de toute contamination est primordiale pour réaliser avec succès un dosage radioimmunologique. Les techniques actuelles de chromatographie permettent de séparer les différentes formes de pepsinogène du porc, les détails sont mentionnés dans l'article précédent (Banga-Mboko *et al.*, 2002). Des préparations commerciales de pepsinogène A (EC 3.4.23.1) sont actuellement disponibles sur le marché et donnent de résultats satisfaisants.

#### La radio iodinisation

Actuellement, le marqueur radioactif le plus utilisé en immuno-analyse est l'Iode 125. En effet, ses caractéristiques physiques de période (60 jours) et de rayonnement (gamma de 35 keV) en font l'isotope de choix: utilisation des trousse pendant 4 à 8 semaines selon la vitesse de la radiolyse du traceur (c'est-à-dire la rupture de la liaison entre l'anticorps ou l'antigène et l'Iode 125), rayonnement gamma donc détectable dans des compteurs à scintillation, mais d'énergie trop faible pour entraîner une irradiation externe du personnel. L'obtention d'une molécule pepsinogène marquée pure, non dégradée et de haute activité spécifique, est une indispensable pour la réalisation d'un RIA sensible, reproductible et spécifique.

#### Les anticorps

Les anticorps font partie du système immunitaire de l'organisme et ils servent à éliminer les substances étrangères à celui-ci. Grâce à leurs remarquables propriétés d'affinité et de spécificité ils permettent aux dosages immunologiques de mesurer de très faibles concentrations d'analytes. Le

dosage par RIA fait intervenir deux anticorps. Les premiers sont obtenus après immunisation du pepsinogène pur chez les lapins selon la méthode décrite par Vaitukaitis et collaborateurs (1971).

Le second anticorps est un anti-gammaglobuline produit chez un animal d'espèce différente de celle utilisée pour fabriquer le premier. Il permet la séparation de l'Ag\* lié et Ag\* libre, par précipitation du complexe Ac-Ag, en se liant au fragment Fc du premier anticorps (ainsi est-il spécifique aux Ig G).

En médecine vétérinaire, le RIA n'a été développé que très tard dans les investigations portant sur les pepsinogènes dans l'espèce porcine (Nappert *et al.*, 1990; Banga-Mboko *et al.*, 2003).

Chez les ruminants par contre, la situation n'est guère réjouissante, l'instabilité de la molécule de pepsinogène (entre autres facteurs) constituerait un obstacle majeur au développement d'un RIA chez les bovins (Gomes *et al.*, 1994). Des recherches sur l'isolement et la purification du pepsinogène bovin sont en cours dans notre laboratoire et devraient aboutir au développement d'un RIA.

En médecine humaine, les nouvelles techniques de chromatographies ayant conduit à la séparation des pepsinogènes A et C, le RIA a supplanté les autres techniques dans le diagnostic des maladies gastro-intestinales et cancéreuses (Samloff et Liebman, 1974; Samloff *et al.*, 1975; Ichinose *et al.*, 1982; Biemond *et al.*, 1989).

#### Dosage par la méthode Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Les méthodes ELISA présentent l'avantage de ne pas utiliser des marqueurs radioactifs. Les premières méthodes de ce type en vue de doser le pepsinogène plasmatique en médecine vétérinaire ont été développées chez les petits ruminants (Turner et Shanks, 1982) puis chez les bovins domestiques en utilisant comme antigène des extraits bruts de parasites gastro-intestinaux (Entrocasso *et al.*, 1986; Berghen *et al.*, 1990).

En utilisant des antigènes d'*Ostertagia* et *C. oncophora*, Ploeger et collaborateurs (1989, 1990) ont observé une différence

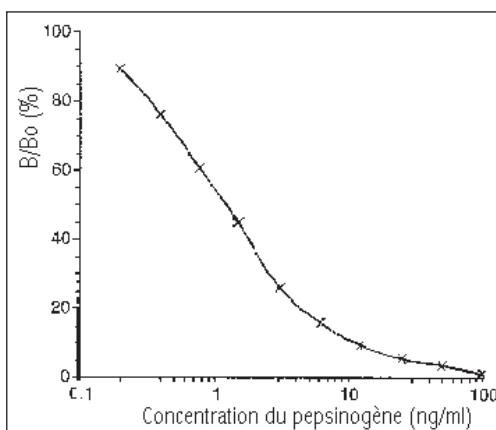


Figure 2: Courbe standard du pepsinogène porcine. La courbe standard était établie sur une échelle linéaire en ordonnée (B/Bo) et une échelle logarithmique en abscisse pour la concentration du pepsinogène. B: est la liaison du traceur et le l'anticorps en présence de l'antigène. Bo est la liaison du traceur et le l'anticorps en absence de l'antigène. Source: Banga-Mboko *et al.*, 2002

significative en pepsinogène entre les animaux sains et parasités. Mais beaucoup de chercheurs dont Frankena (1987) ont rapporté dans la plupart des cas que les résultats des ELISA utilisant des broyats de vers comme antigènes sont difficilement interprétables par le fait que les épitopes antigéniques sont partagés par plusieurs autres parasites et peuvent donc induire des réactions croisées avec d'autres nématodes. En plus, le fait qu'il existe des variations entre hôtes dans la réponse immunitaire contre les infestations gastro-intestinales rendent difficile la comparaison des résultats, suggérant que les tests ELISA ne sont pas recommandés pour des diagnostic individuels. Des études sont actuellement menées en vue d'utiliser comme antigène des protéines recombinantes de *C. oncophora* et les résultats s'avèrent prometteurs (Eysker et Ploeger, 2000).

En médecine humaine, la purification et la séparation par chromatographie des pepsinogènes A et C ont permis le développement des tests ELISA dont la corrélation avec le RIA est excellente ( $r = 0.95$ ) (Pals *et al.*, 1987).

## MISE EN EVIDENCE DES PATHOLOGIES GASTRIQUES PAR DOSAGE DU PEPSINOGENE SANGUIN

### Le dosage du pepsinogène en relation avec les ulcères

#### Généralités sur les ulcères du porc

Les ulcères gastriques du porc sont principalement localisés dans la partie oesophagogastrique (*pars oesophagea*). Ils se développent à partir d'une interaction complexe entre la taille des particules alimentaires, la fluidité gastrique, le contenu des nutriments carbonés et la présence de certaines bactéries commensales gastriques capables de fermenter les nutriments carbonés (Queiroz *et al.*, 1996; Krakowka *et al.*, 1998). Ils sont fréquemment rencontrés dans tous les élevages de porc et leur prévalence a augmenté avec l'intensification de la production porcine. Les ulcères de la *pars oesophagea* touchent davantage les porcs en croissance et les truies (Elbers *et al.*, 1995; Martineau, 1997; Makinde et Gous, 1998; Doster, 2000).

Les ulcères induisent une baisse du gain moyen quotidien, une augmentation de l'indice de consommation et des mortalités subites pouvant atteindre 3 à 4% (Blackshaw et Kelly, 1980). La baisse des performances de croissance est d'autant plus prononcée que le niveau de performance de l'élevage est élevé (Martineau, 1997; Baumann, 2002). Les ulcères peuvent également être asymptomatiques. Il existe cependant des formes cliniques suraiguës, aiguës ou chroniques. Dans la forme suraiguë, il s'agit d'une mort brutale, sans prodrome, de porcs apparemment sains. Dans la forme aiguë, des signes cliniques peuvent apparaître: inappétence, vomissement, retard de croissance, pyalisme, constipation, méléna, anémie, respiration courte et rapide, douleur épigastrique, grincement de dents (Desrosiers, 1989).

Les changements macroscopiques induits par les ulcères ont été abondamment étudiés (Kowalczyk *et al.*, 1960; Muggenburg *et al.*, 1964; Embaye *et al.*, 1990; Hessing *et al.*, 1992; Elbers et Dirkwager, 1994; Queiroz *et al.*, 1996; Legal, 2000). La muqueuse gastrique devient rugueuse puis plissée, plus ou moins jaune, colorée par la bile: c'est la parakérotose. Si l'influence ulcérogénique est maintenue, des fissures apparaissent puis des érosions et enfin des ulcères. Chez les porcs qui en meurent, l'ulcère a la forme d'un cratère aux bords bien définis recouverts de tissus nécrotiques et du sang caillé (Desrosiers, 1989). L'ulcère est souvent unique, circulaire et d'un diamètre de 4 à 10 cm. Dans la forme suraiguë, l'estomac est souvent rempli d'un mélange de caillots de sang et d'aliment. Dans certains cas, l'ulcère guérit spontanément. Il laisse alors des cicatrices qui peuvent réduire le diamètre de l'entrée de l'estomac produisant ainsi des porcs chétifs à croissance fortement ralentie.

#### Valeurs sanguines en pepsinogène

Les recherches en vue de diagnostiquer les lésions gastriques par dosage du pepsinogène sont mentionnées dans le tableau I. Dans ce tableau figurent également la taille des échantillons, les techniques utilisées, la comparaison des valeurs sériques ou plasmatiques du pepsinogène entre les porcs sains et les malades. Depuis la reconnaissance de l'implication

évidente des sécrétions gastriques dans l'ulcérogénèse, les travaux menés jusqu'à ce jour visent à corréliser les lésions observées *post-mortem* dans la *pars oesophagea* avec la concentration du pepsinogène sanguin. Les investigations ont en général été menées dans les abattoirs et classaient les lésions en trois catégories: les parakérotinisations, les érosions et les ulcères. Les premiers travaux ont été entrepris par Zamora et collaborateurs (1975). Ces auteurs sont parvenus à la conclusion selon laquelle le pepsinogène sanguin et les corticoïdes plasmatiques ne présentent pas de corrélation avec les lésions observées dans la *pars oesophagea*, celles-ci pouvant être un indicateur de stress. En 1981, Bunn et collaborateurs ont affiné les investigations en mesurant le pepsinogène sanguin en plus de la gastrine. Malheureusement, aucune différence n'a été trouvée entre les animaux sains et ceux porteurs d'ulcères.

Nappert et collaborateurs (1990) développèrent un premier RIA en utilisant comme antigène le pepsinogène commercial et des antisérums obtenus par immunisation de lapins. Les valeurs de pepsinogène dans les troupeaux de porcs malades étaient toujours plus élevées mais il n'y avait pas de différence significative avec les porcs sains.

L'analyse des valeurs plasmatiques du tableau I, montre que celles-ci varient d'un laboratoire à l'autre et rendent difficile l'interprétation des résultats. Ceci explique l'abandon de cette approche en ce qui concerne la détection des ulcères gastriques chez le porc. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cela.

La première trouve son fondement sur la qualité du test utilisé. En effet, les méthodes protéolytiques comme nous l'avons souligné, consistent à doser l'activité de la pepsine sur un substrat comme l'albumine ou l'hémoglobine. Bien que la méthode protéolytique soit satisfaisante en elle-même, il faut souligner la diversité des résultats d'un auteur à l'autre. Ce manque d'homogénéité pourrait s'expliquer, soit par une variation d'ordre opératoire concernant la nature du substrat, soit par la diversité génétique des pepsinogènes, d'où la difficulté de rassembler une population témoin.

La seconde hypothèse trouve son origine dans la diversité des pepsino-

Tableau I : Valeurs diagnostiques du pepsinogène sanguin en relation avec les ulcères gastriques chez le porc.

Auteur	Taille de l'échantillon (n)	Technique de laboratoire	Pepsinogène (témoins)	Pepsinogène (animaux avec ulcères)	Mode d'élevage
Zamora <i>et al.</i> , 1975	40	Méthode protéolytique	1,3*	1,8*	intensif
Bunn <i>et al.</i> , 1981	38	Méthode protéolytique	887-1596**	887-1596**	intensif
Nappert <i>et al.</i> , 1990	136	RIA	1,5***	5,15***	intensif
Elbers <i>et al.</i> , 1995	557	Méthode protéolytique	1575.4±587**	1651.8±456****	intensif

Unités : \* : mg tyrosine/mole  
 \*\* : milliunités de pepsinogène  
 \*\*\* : ng/ml  
 \*\*\*\* : µmole/litre

Tableau II : Prévalence de *Hyostrogylus rubidus* chez le porc.

Auteur	Taille de l'échantillon	Prévalence (%)	Technique de diagnostic
Baskerville <i>et al.</i> , 1970	60	25	Coprologie
Castelino <i>et al.</i> , 1970	1656	47,5	Coprologie
Pattison <i>et al.</i> , 1980	180	28,5	Coprologie
Gibbens <i>et al.</i> , 1989	137	60	Coprologie
Chartier <i>et al.</i> , 1990	82	80	Coprologie
Salifu <i>et al.</i> , 1990	1000	13,10	Coprologie
Barutzi <i>et al.</i> , 1991	39	14,5	Coprologie
Permin <i>et al.</i> , 1999	259	60,6	Coprologie

Tableau III : Valeur diagnostique du pepsinogène sanguin en relation avec une infestation à *Hyostrogylus rubidus* chez le porc

Auteur année	Taille de l'échantillon	Méthode de dosage	Type d'infection	Valeurs diagnostiques des porcs sains mU Tyr	Valeurs diagnostiques des porcs infectés mU Tyr	Doses infectantes (larves L3)
Enight, 1972	4	protéolytique	expérimental	350 <sup>a</sup>	900 <sup>b</sup>	10000
Titchener <i>et al.</i> , 1974	10	protéolytique	expérimental	1000 à 2500 <sup>a</sup>	7000 à 1100 <sup>b</sup>	60000 200000 350000 500000
Dangolla <i>et al.</i> , 1994	18	protéolytique	expérimental	1,27 <sup>a</sup>	1,37 <sup>b</sup>	8000

Sur une même ligne, deux valeurs qui ne sont pas suivies par une même lettre, sont statistiquement différentes (P < 0,05).

gènes et l'hétérogénéité des préparations commerciales (Samloff et Liebman, 1972). Il est donc probable que les valeurs plasmatiques présentées dans le tableau I pourraient concerner différentes formes de pepsinogènes d'où l'impossibilité de les comparer.

Enfin, la dernière hypothèse pourrait reposer sur la particularité anatomique et physiologique de la *pars oesophagea*. En effet, comparé aux autres espèces domestiques, les ulcères chez le porc ont, non seulement, une origine multifactorielle mais sont en plus localisés loin du site classique de production du pepsinogène et de l'acide chlorhydrique, en l'occurrence la région fundique. De plus, le fait que la *pars oesophagea* soit dépourvue de glandes digestives, rend plus difficile l'établissement de la corrélation entre les lésions observées dans la région oesophagienne et le pepsinogène sécrété dans la région fundique (Figure 3). Par ailleurs les travaux de Queiroz et collaborateurs (1996) montrent de façon surprenante que les ulcères de la *pars oesophagea*

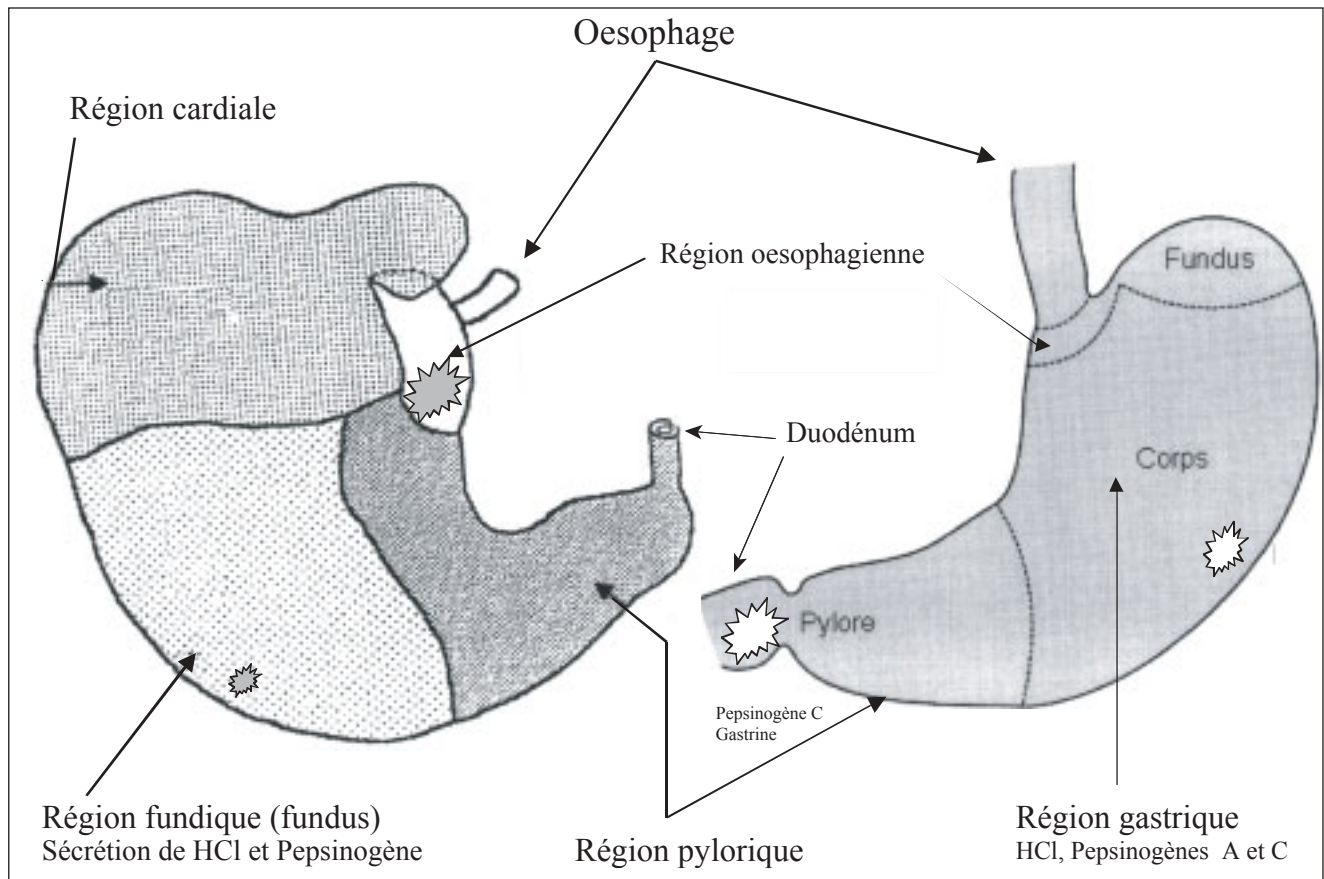
sont associés à la présence des hélicobactéries dans l'estomac du porc. Cependant, chez l'homme et les ruminants, les ulcères sont observés dans les régions spécialisées dans la sécrétion du pepsinogène et de l'acide chlorhydrique. De ce fait, une altération des cellules principales ou des cellules pariétales engendre directement un passage accru du pepsinogène dans le courant sanguin, ce qui paraît tout à fait évident.

### Mise en évidence de la verminose à *Hyostromylus rubidus* par dosage du pepsinogène sanguin

#### Généralités sur l'infection parasitaire à *Hyostromylus rubidus*

Plusieurs travaux ont été consacrés à l'étude de *H. rubidus* et portent notamment sur la pathologie, le diagnostic et le traitement de l'affection gastrique (Kendall et Small, 1974; Troncy et Chartier, 1981; Stewart *et al.*, 1985; Kaufmann, 1996; Martineau, 1997). *H. rubidus* est éga-

lement appelé le ver rouge de l'estomac à cause de son caractère hémato-phage. Il mesure de 5 à 10 mm de long. Il colonise surtout la région du fundus. Les larves se développent dans la lumière de la glande fundique. L'élevage des animaux à l'extérieur constitue le principal facteur de risque. Sa prévalence est très élevée (13 à 60 %) dans les zones où les porcs ont l'occasion de pâturer (tableau II). L'infestation est en général asymptomatique. Cependant, lors d'infestations massives, des signes cliniques peuvent être observés: anorexie, vomissement et anémie. Il peut être observé un simple épaissement de la muqueuse. Celle-ci est alors recouverte d'un mucus abondant avec la présence du parasite. Parfois, ce sont des lésions d'inflammation hémorragique avec de larges ulcères recouverts de fausses membranes jaunâtres sous lesquelles les vers sont fixés à la muqueuse ou des nodules multiples provoqués par des larves du parasite enfoncées dans la muqueuse. Le diagnostic repose sur l'observation des signes cliniques, des lésions



**Figure 3 :** Distribution comparée des ulcères gastriques (☆) en relation avec les sites classiques de sécrétion du pepsinogène chez l'homme (à droite) et le porc (à gauche). Les ulcères ont une origine gastrique chez l'homme et oesophagienne chez le porc. Cependant la synthèse du pepsinogène a lieu dans les mêmes compartiments gastriques chez les deux espèces.  
Source: dessin reconstitué par les auteurs d'après la revue de la littérature

gastriques à l'abattoir ou sur cadavres mais surtout sur l'examen coprologique.

### **Valeurs sanguines en relation avec une parasitose à *H. rubidus***

La chronologie des recherches menées en vue de confirmer l'hyostromylose par dosage du pepsinogène sanguin sont résumées sur le tableau III.

Enight et collaborateurs (1972) entreprirent une expérience avec quatre porcelets de douze semaines: deux avaient été expérimentalement infectés avec une dose unique de 10000 larves L3 de *H. rubidus*, les deux autres ayant servi de témoins. Le pepsinogène fut dosé à des périodes précises. La concentration du pepsinogène dans le sang a augmenté du 4<sup>e</sup> au 9<sup>e</sup> jour après l'infestation puis a diminué sans pour autant atteindre la valeur initiale.

Ces travaux ont été repris plus tard par Titchener et collaborateurs (1974) dans une série d'expériences dans lesquelles les porcs furent infectés expérimentalement avec 60000, 200000, 350000 et 500000 larves L3. Les signes cliniques ne furent observés que chez des porcs ayant reçu des doses infectantes supérieures à 200000 larves. Par ailleurs, la concentration du pepsinogène sanguin fut significativement différente entre les témoins et les animaux malades. De même, deux pics relatifs à un accroissement de l'activité protéolytique du pepsinogène ont été observés. Le premier correspondait à la période qui suivait l'infestation larvaire de la muqueuse gastrique; le second correspondait à la période durant laquelle les vers adultes migraient dans la surface de la muqueuse de l'estomac. Le taux élevé en pepsinogène était supérieur lors du premier pic.

Ces travaux associés à ceux de Dongolla et collaborateurs (1994) permettent de conclure qu'une infestation parasitaire entraîne une augmentation de la concentration du pepsinogène sanguin à partir d'une charge parasitaire de 10000 larves L3. Cependant, ces résultats ne permettent pas de faire une correspondance avec la coproscopie. En effet, cette technique ne permet aucune interprétation quantitative des infestations. En coproscopie par exemple, une numération de 300 à 1200 œufs par gramme correspond à

une hyostromylose clinique du porc adulte, mais la concentration correspondante du pepsinogène est inconnue. De même, aucune donnée n'est disponible sur la concentration du pepsinogène au cours d'un traitement anthelminthique. Cependant, chez les ruminants, Kerboeuf et collaborateurs (1982) ont établi une méthode d'interprétation quantitative des infestations parasitaires. Actuellement, le dosage du pepsinogène sanguin sert à contrôler l'effet d'un traitement anthelminthique chez les ruminants (Kerboeuf, 1979; Ploeger *et al.*, 1989; Ploeger *et al.*, 1990).

### **CONCLUSION**

Le passage du pepsinogène dans le courant sanguin est connu depuis quelques décennies. Des méthodes de dosage du pepsinogène sanguin en vue de suspecter l'existence des ulcères et les infestations parasitaires à *Hyostromylos rubidus* chez le porc ont été développées dans plusieurs laboratoires. En ce qui concerne l'ulcère gastrique, aucune corrélation n'a été établie entre les lésions observées (parakératose, érosion et ulcère) et la concentration du pepsinogène sanguin.

Les méthodes de dosage basées sur la mesure de l'activité enzymatique de la pepsine ont eu pour conséquence une dispersion des valeurs plasmatiques du pepsinogène sanguin rendant ainsi les résultats difficilement interprétables. La nature du substrat utilisé et certainement l'hétérogénéité des pepsinogènes en sont les raisons majeures. Les progrès réalisés en biochimie dans l'isolement et la purification des zymogènes devraient converger vers le développement des techniques de diagnostic plus spécifiques; en l'occurrence les dosages immunologiques. Les études cliniques ne deviendront interprétables qu'à ce prix.

En revanche, il apparaît clairement que la concentration du pepsinogène est positivement corrélée avec la gravité de l'infestation parasitaire à *H. rubidus* et ce, à partir d'une dose de 10000 larves L3. Ces résultats bien qu'encourageants ne permettent pas encore de prédire le nombre de vers présents dans l'estomac et encore moins de juger de l'efficacité d'un traitement anthelminthique.

A l'heure actuelle, la recrudescence de l'incidence des ulcères dans les élevages intensifs d'une part et le regain d'intérêt vers un retour à l'agriculture biologique dans la plupart des pays producteurs de porcs d'autre part (mis au vert des porcs), donc une exposition aux infestations parasitaires, doivent être pris en considération. Une amélioration des méthodes de détection *ante mortem* des maladies digestives qui se manifestent par un accroissement du pepsinogène sanguin semble être indispensable.

### **REMERCIEMENTS**

Le premier auteur remercie Philippe Muller, Raja Fares, Bernard Lelou, Issacka Youssao et Mazen Alomar pour leur collaboration et les deux lecteurs anonymes pour leurs fructueuses critiques et suggestions.

### **The use of blood pepsinogen as a biomarker of the integrity of the porcine gastric mucosa.**

### **2. Measurements of blood pepsinogen and its usefulness in the detection of gastric diseases.**

### **SUMMARY**

Pepsinogen is one component of the gastric juice which participates in the digestion. This macromolecule enters the blood circulation in a small measurable quantities in healthy subjects. Therefore, blood pepsinogen is claimed to be an indicator of the integrity of the gastric mucosa. This paper was written to review the use of porcine in the diagnostic of stomach ulcers and *Hyostromylos rubidus* infection. The methods of measurement of blood pepsinogen and the diagnostic values are discussed.

## BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON N., ARMOUR J., JARRET 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.
- ANSON M.L., MIRSKY A. E. The estimation of pepsin with haemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 1932, **16**, 59-63.
- BANGA-MBOKO H., SULON J., CLOSSET J., REMY B., EI AMIRI B., YOUSAO I., MELO DE SOUSA N.M., BECKERS J.F. Radioimmunoassay of porcine pepsinogen. In: Second Belgian Workshop on Animal Endocrinology, Leuven (Belgium), November 15th 2001(5). *Biotech. Agron. Sociol. Environ.* pp 25-6.
- BANGA-MBOKO H., GODEAU J.M., DRION P.V., EL AMIRI B., DRION V., PERENYI Z., SOUSA N.M., BECKERS J.F. Evaluation de l'utilisation du pepsinogène sanguine comme biomarqueur de l'intégrité de la muqueuse gastrique chez le porc. 1. Historique, physiopathologie de la muqueuse gastrique et différentes formes de pepsinogènes. *Ann. Méd. Vét.*, 2002, **146** :339-346.
- BANGA-MBOKO H., SULON J., CLOSSET J., REMY B., YOUSAO I., MELO DE SOUSA N.M., EI 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.
- BASKERVILLE A., ROSS J.G. Observations on experimental and field infections of pigs with *Hyostrogylus rubidus*. *Br. Vet. J.*, 1970, **126**, 538-542.
- BARUTZI D., SCHOIERER R., GOTHE R. Helminth infections in wild boars kept in enclosures in southern Germany: severity of infections and fecal intensity. *Tierarztl. Prax.*, 1991, **19**, 644-648.
- BAUMANN B., BILKEI G. Emergency-culling and mortality in growing/fattening pigs in a large Hungarian "farrows to finish" production unit. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 2002, **109**, 26-33.
- BERGHEN P., DORNY P., HILDERSON H., VERCUYSSE J., HOLLANDERS W. Observations on parasitic gastroenteritis and parasitic bronchitis in calves over two grazing seasons. *Vet. Rec.*, 1990, **127**, 426-430.
- BERGHEN P., HILDERSON H., VERCUYSSE J., DORNY P. Evaluation of pepsinogen, gastrin and antibody response in diagnosing ostertagiasis. *Vet. Parasitol.*, 1993, **46**, 175-195.
- BIEMOND I., JANSSEN J.B., CROBACH L.F., KREUNING J., LAMERS C.B. Radioimmunoassay of human pepsinogen A and pepsinogen C. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1989, **27**, 19-26.
- BLACKSHAW J.K., KELLY W.R. Effects of gastric ulceration on growth rate of intensively reared pigs. *Vet. Rec.*, 1980, **106**, 52-54.
- BONFILS S., VATIER J., ZEITOUN P., DUBRASQUET M., LEMERCIER Y. Sur quelques problèmes posés par le dosage de l'activité protéolytique (activité peptique) du suc gastrique humain. *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol.*, 1967, **12**, 349.
- BUNN C.M., HANSKY J., KELLY A., TITCHEN D.A. Observations on plasma gastrin and plasma pepsinogen in relation to weaning and gastric (*pars oesophagea*) ulcerations in pigs. *Res. Vet. Sci.*, 1981, **30**, 376-378.
- CASTELINO J.B., THOMAS M., HERBERT I.V., LEAN I.H. A survey of the prevalence of *Hyostrogylus rubidus* in breeding pigs slaughtered in North Wales. *Vet. Rec.*, 1970, **87**, 256-257.
- CHARTIER C., MUTESI U., NDAKALA N.O. Les helminthes du porc domestique en Ituri, Haut Zaïre. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 1990, **70**, 213-225.
- CHERET A.M., BONFILS S. Pepsine et pepsinogène. Origine, propriétés et préparation. *Path. Biol.*, 1970, **18**, 317-342.
- DANGOLLA A., BJØRN 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.
- DESROSIERS. L'ulcère gastrique et ses conséquences. *Med. Vet. Québec*, 1989, numéro spécial, 13-14.
- DORNY P., VERCUYSSE J. Evaluation of a micro method for the routine determination of serum pepsinogen in cattle. *Res. Vet. Sci.*, 1998, **65**, 259-262.
- DOSTER A.R. Porcine gastric ulcer. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.*, 2000, **16**, 163-174.
- ELBERS ARW., DIRKZWAGER A. Changes in stomach mucosa in swine. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 1994, 119, 669-74.
- ELBERS A.R., HESSING M.J., TIELEN M.J., VOS J.H., GROWTHAND. Oesophagogastric lesions in finishing pigs offered pelleted feed ad libitum. *Vet. Rec.*, 1995, **136**, 588-90.
- EMBAYE H., THOMLINSON J.R., LAWRENCE T.L. Histopathology of oesophagogastric lesions in pigs. *J. Comp. Pathol.*, 1990, **103**, 253-264.
- ENIGHT K., DEY-HAZRA A., FEDER H. Influence of *Hyostrogylus* infection on plasma pepsinogen content and electrolyte concentration of gastric juice in the pig. *Zentralb. Vet.*, 1972, **19**, 416-25.
- ENTROCASSO C., McKELLAR Q. PARKINGS J.J., BAIRDEN K., ARMOUR J. The sequential development of type I and type II *ostertagiasis* in young cattle with special reference to biochemical and serological changes. *Vet. Parasitol.*, 1986, **21**, 173-188.
- EYSKER, M., PLOEGER, H.W. Value of present diagnostic for gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Parasitology*, 2000, **120**, 109-19.
- FRANKENA K. The interactions between *Cooperia* spp and *Ostertagia* spp. (Nematoda : Trichostrongylidae) in cattle. (PhD thesis), Landbouwniversiteit: Wageningen, 1987, 101p.
- GIBBENS J.C., GIBBENS N.P., FIELDING W.J. An abattoir survey of the prevalence of gastro-intestinal helminths and *Stephanurus dentatus* in pigs in Belize. *Trop. Anim. Health. Prod.*, 1989, **21**, 197-204.



- 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**, 157-70.
- GREENWOOD F.C., HUNTER W.M., GLOVER J.S. The preparation of <sup>131</sup>I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, 1963, **89**, 114-123.
- HESSING M.J., GEUDEKE M.J., SCHEEPENS C.J., TIELLEN M.J., SCHOUTEN W.G., WIEPKEMA P.R. Mucosal lesions in the pars oesophagus in swine: prevalence and the effect of stress. *Tijdschr. Diergeneeskd.*, 1992, **117**, 445-450.
- HILDERSON H., BERGHEN P., VERCRUYSSSE J., DORNY P., BRAEM L. The diagnostic value of pepsinogen for clinical diagnosis. *Vet. Rec.*, 1989, **125**, 376-377.
- ICHINOSE M., MIKI K., FURIHATA C., KAGEYAMA THAYASHI R., NIWA H., OKA H., MASUSHIMA T., TAKAHASHI K. Radioimmunoassay of serum group I and group II pepsinogens in normal controls and patients with disorders. *Clinical Chim. Acta.*, 1982, **126**, 183-191.
- JENNINGS F.W., ARMOUR J., LANSSON D.D., ROBERTS R. Experimental Ostertagia infections in calves: studies with abomasal cannulas. *Am. J. Vet. Res.*, 1966, **27**, 1249-1257.
- KAUFMANN J. Parasites in swine. In : Kaufmann J., Parasitic infections of domestic animals. Birkhauser V. (Eds) : Basel, 1996, 292-308.
- KENDALL S.B., SMALL A.J. *Hyostroglylus rubidus* in sows at pasture. *Vet. Rec.*, 1974, **95**, 388-390.
- KERBOEUF D. Le dosage du pepsinogène sanguin, élément de diagnostic dans les strongyloses gastriques des ruminants. *Rev. Med. Vet.*, 1979, **130**, 1359-1370.
- KERBOEUF D., MAGE C., GARFF L.E. Dosage du pepsinogène et prévision du nombre de vers dans la caillette. *Bull. Group. Tech. Vet.*, 1982, **233**, 13-21.
- KOWALCZYK T., HOEKSTRA W.G., PUESTOW K.L., SMITH I.D., GRUMMER R.H. Stomach ulcers in swine. *Am. Vet. Med. Ass.*, 1960, **137**, 339-345.
- KRAKOWKA S., EATON K.A., RINGS D.M., ARGENZIO R.A. Experimental disease: Production of gastroesophageal erosions and ulcers (GEU) in gnotobiotic swine monoinfected with fermentative commensally bacteria and fed high- carbohydrate diet. *Vet. Pathol.*, 1998, **35**, 274-282.
- LEGAL A: Hélicobactéries et affections gastriques chez le porc charcutier, (Thèse de Doctorat en Médecine Vétérinaire). Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (ENV), Nantes (France), 2000, 88p.
- LOMBARTS A. J.P. F., PETERS, S. H. Routine determinations of serum pepsinogen. *Clin. Chem. Acta.*, 1972, **36**, 195-200.
- MAKINDE M.O., GOUS T.A. Prevalence of gastro-oesophageal ulcers in grower- finisher pigs in the northern province of South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 1998, **69**, 59-60.
- MARTINEAU G.P. Les maladies d'élevage des porcs. France Agricole : Paris, 1997, 480p.
- MIRSKY A., FUTTERMAN P., KAPLAN S., BROHHAHN R.H. The source, properties, and proteolytic assay of the activity of plasma acid reactions. *J. lab. Clin. Med.*, 1952, **40**, 17-26.
- MUGGENBURG B.A., Mc.NUTT S.H., KOWALCZYK T. Pathology of gastric ulcers in swine. *Am. J. Vet. Res.*, 1964, **25**, 1354-1365.
- NAPPERT G., VRINS A., BEAUREGARD M., VERMETTE L., LARIVIERE N. Radioimmunoassay of serum pepsinogen in relation to gastric (*pars oesophagea*) ulceration in swine herds. *Can. J. Vet. Res.*, 1990, **54**, 390-393.
- PALS G., RASANEN V., MEUWISSEN S.G., FRANTS R.R., KOSTENSE P.J., ERIKSON A.W. Enzyme-linked immunosorbent assay and radioimmunoassay of serum pepsinogen A. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1987, **47**, 29-33.
- PATTISON H.D., THOMAS R.J., SMITH W.C. A survey of gastrointestinal parasitism in pigs. *Vet. Rec.*, 1980, **107**, 415-418.
- PERMIN A., YELIFARI L., BLOCH P., STEENHARD N., HANSEN NP., NANSEN P. Parasites in cross- bred pigs in the Upper East region of Ghana. *Vet. Parasitol.*, 1999, **87**, 63-71.
- PLOEGER H.W., SCHOENMAKER G.J.W., KLOOSTERMAN A., BORGSTEEDE F.H. Effect of anthelmintic treatment of dairy cattle on milk production related to some parameters estimating worm infection. *Vet. Parasitol.*, 1989, **34**, 239-254.
- PLOEGER H.W., KLOOSTERMAN A., BARGEMAN G., VON WUIJCKHUISE L.W., DEN BRINK. R. Milk yield increase after anthelmintic treatment of dairy cattle related to some parameters estimating worm infections. *Vet. Parasitol.*, 1990, **35**, 103-106.
- QUEIROZ D.M.M., ROCHA G.A., MENDES E.N., MOURA S.B., OLIVEIRA A.M.R., MIRANDA D. Association between *Helicobacter* and gastric ulcer disease of the *pars oesophagea* in swine. *Gastroenterology*, 1996, **111**, 19-27.
- RYLE AP., PORTER R.R. Parapepsins: two proteolytic enzymes associated with porcine pepsin . *Biochem. J.*, 1959, **73**, 75-86.
- SALIFU D.A., MANGA.T.B., PONYTAIL I.O. A survey of gastro-intestinal parasites in pigs of the plateau and rivers states of Nigeria. *Rev. Elev. Vet. Pays. Trop.*, 1990, **43**, 193-196.
- SAMLOFF I.M., LIEBMAN W.M. Immunochemical heterogeneity of commercial hog pepsinogen. *Immunochemistry*, 1972, **9**, 663-667.
- SAMLOFF I.M., LIEBMAN, W.M. Radioimmunoassays of group I pepsinogens in serum. *Gastroenterology*, 1974, **66**, 494-502.
- SAMLOFF I.M., LIEBMAN W.M., PANTCH N.M. Serums group I pepsinogens by Radioimmunoassay in control subjects and patients with peptic ulcer. *Gastroenterology*, 1975, **69**, 83-90.

- SAMLOFF I.M., SECRIST D., PASSARO E.J.R. Serum group I pepsinogen levels and their relation to gastric and acid secretion in patients with and without recurrent ulcer. *Gastroenterology*, 1976, **70**, 309-313.
- STEWART T.B., HALE O.M., MARTI O.G. Experimental infections with *Hyostromylus rubidus* and the effects on performance of growing pigs. *Vet. Parasitol.*, 1985, **17**, 219-27.
- TITCHENER R.N., HERBERT I.V., PROBERT A.J. Plasma protein loss in growing pigs during the prepatent and early patent periods of infection with high doses of *Hyostromylus rubidus* larvae. *J. Comp. Path.*, 1974, **84**, 399-407.
- TRONCY P.M., CHARTIER C. Les helminthoses digestives des ruminants et du porc. In : Chartier C., Itard J., Morel P.C, Troncy P.M (Eds), Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. Tec & Doc : Paris, 1981, 5-82.
- TURNER J.C., SHANKS V. An enzyme-linked immunoassay for pepsinogen in sheep plasma *Vet. Parasitol.*, 1982, **10**, 79-86
- VAGNE M., MARTIN F., LAMBERT R. Dosage de la pepsine dans la sécrétion gastrique humaine. Influence de différents facteurs sur la protéolyse peptique. *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol.*, 1967, **12**, 559.
- VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAG E., ROSS G.T. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1971, **33**, 988-991.
- VATIER J., CHERET A.M., BONFILS S. Le dosage automatique de l'activité protéolytique du suc gastrique. *Biol. Gastro Ent.*, 1968, **1**, 15-29.
- ZAMORA C.S., KOWALCZYK T., HOEKSTRA W.G., GRUMMER R.H., WILL J.A. Plasma concentration of pepsinogen and corticosteroid in relation to gastric lesions in swine. *Am. J. Vet. Res.*, 1975, **36**, 1327-1329.