

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE : CHIMIE BIOLOGIE

DÉTECTION DE L'ADMINISTRATION DE L'HORMONE DE
CROISSANCE ÉQUINE RECOMBINANTE : APPLICATION AU
CONTRÔLE ANTIDOPAGE DANS LES COURSES HIPPIQUES

THÈSE DE DOCTORAT

DISCIPLINE : BIOCHIMIE
SPÉCIALITÉ : BIOMOLÉCULES

présentée
et soutenue publiquement par

Ludovic BAILLY-CHOURIBERRY

le 23 Novembre 2007, devant le jury ci-dessous :

Rapporteurs	Monsieur Jean-Claude TABET <i>Professeur, Faculté des Sciences, Université Paris VI</i> Monsieur Michel AUDRAN <i>Professeur, Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier</i>
Examineurs	Monsieur David RONDEAU <i>Maître de Conférence, Faculté des Sciences, Université d'Angers</i> Monsieur Charles TELLIER <i>Professeur, Faculté des Sciences et des Techniques, Université de Nantes</i> Monsieur Yves BONNAIRE <i>Directeur du Laboratoire des Courses Hippiques</i> Monsieur Bruno LE BIZEC <i>Professeur, École Nationale Vétérinaire de Nantes</i>
Membres invités	Madame Gaud PINEL <i>Ingénieur de recherche, École Nationale Vétérinaire de Nantes</i> Madame Geneviève ANDRÉ-FONTAINE <i>Professeur, École Nationale Vétérinaire de Nantes</i>

*À mes parents,
À Stéphanie,
À ma famille.*

« Rien ne se fait sans un peu d'enthousiasme »

[Voltaire] - Extrait d'une *Lettre*

Aux membres du jury de thèse,

Monsieur le Professeur Jean-Claude TABET, directeur du Laboratoire de Chimie Structurale Organique et Biologique (LCSOB) de la Faculté des Sciences à l'Université Pierre et Marie CURIE de Paris VI,

Monsieur le Professeur Michel AUDRAN, directeur du Laboratoire de Biophysique et de Bioanalyse de la Faculté de Pharmacie à l'Université de Montpellier,

Monsieur le Docteur David RONDEAU, maître de conférence et ingénieur de recherche au Laboratoire de Chimie, Ingénierie Moléculaire et Matériaux de la Faculté des Sciences à l'Université d'Angers,

Monsieur le Professeur Charles TELLIER, directeur adjoint du Laboratoire de Biotechnologie, Biocatalyse et Biorégulation de la Faculté des Sciences et des Techniques à l'Université de Nantes,

Madame le Professeur Geneviève ANDRÉ-FONTAINE, directrice du Laboratoire de Bactériologie et Biologie Moléculaire des Leptospires à l'ENV de Nantes,

Madame le Docteur Gaud PINEL, ingénieur de recherche au Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) à l'ENV de Nantes,

Monsieur le Docteur Yves BONNAIRE, directeur du Laboratoire des Courses Hippiques (LCH) à Verrières-le-Buisson,

Monsieur le Professeur Bruno LE BIZEC, directeur du Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) à l'ENV de Nantes,

qui m'ont fait l'honneur de lire et de juger ce travail, et que je remercie pour le temps qu'ils y ont consacré.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à M. Yves BONNAIRE, M. François ANDRÉ et M. Bruno LE BIZEC, pour la confiance qu'ils m'ont accordée lors de la réalisation de ce travail au sein du Laboratoire des Courses Hippiques et du Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), pour m'avoir fait profiter d'excellentes conditions de travail et de rencontres enrichissantes ainsi que pour leur encadrement scientifique de très grande qualité et la valeur de leurs conseils.

Je tiens également à remercier très sincèrement Mme Gaud PINEL, M. Patrice GARCIA, Mme Marie-Agnès POPOT et M. Louis DEHENNIN, pour leur disponibilité, leur écoute toujours immédiate, et pour leur soutien déterminant dans l'aboutissement de cette thèse.

Je tiens ensuite à remercier Messieurs Fabrice MONTEAU, Daniel MAUME et Yves MOULARD pour m'avoir fait profiter de leurs grandes compétences en spectrométrie de masse ainsi que pour leur soutien, leur aide et leur disponibilité tout au long de ce travail.

Je tiens également à remercier très sincèrement les personnes qui ont contribué à ce travail, notamment M^{lle} Émeline CHU-VAN pour sa rigueur et sa disponibilité lors de sa participation au développement du test ELISA ; Mme Geneviève ANDRÉ-FONTAINE, M^{lle} Florence AVIAT, Mme Sandrine ROULET du Laboratoire de Bactériologie et Biologie Moléculaire des Leptospires à l'ENV de Nantes pour leur aide lors de la purification d'anticorps et pour la réalisation de Western-Blot ; M. Jean-Jacques GARIN pour la réalisation des expérimentations animales sur les chevaux ; M. Daniel GUILLAUME de l'INRA de Tours-Nouzilly, unité de recherche de Physiologie de la Reproduction et des Comportements (PRC) pour les dosages de GH par RIA ; M. Eric GÉNIN de la société ThermoScientific pour sa disponibilité et ses conseils en spectrométrie de masse.

Je remercie pour leur soutien et pour les nombreux moments de réconforts partagés M^{elles} Marie-Hélène LEBRETON, Blandine DESTREZ, Julie LE FAUDER, Corinne BUISSON, Stéphanie CHRISTIEN et M. Cyril COLAS, ainsi que M^{lle} Frédérique COURANT.

Enfin, je tiens à remercier l'ensemble du personnel du LCH et du LABERCA, dont les compétences réunies ont constitué le socle solide indispensable au développement de ce projet.

Je remercie également toutes les personnes qui ont, à leur façon, participé à ce travail de thèse : ma famille, mes amis.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	xvii
LISTE DES TABLEAUX.....	xxv
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xxxix
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE - I TRAVAUX ANTÉRIEURS.....	13
PARTIE - 1 HORMONE DE CROISSANCE.....	15
1. Définition d'une hormone.....	15
2. Définition d'une protéine.....	15
3. L'hormone de croissance.....	19
3.1. Production par l'hypophyse.....	19
3.2. Production par l'hippocampe.....	21
3.3. Gènes, polymorphisme allélique.....	21
3.4. Structure de l'hormone de croissance.....	23
3.4.1. Structure primaire et secondaire de l'hormone de croissance.....	23
3.4.1.1. Modifications post-traductionnelles et isoformes.....	25
3.4.1.2. Modifications chimiques in vitro.....	27
3.4.1.3. Point isoélectrique des hormones de croissance.....	27
3.4.2. Structure tertiaire de l'hormone de croissance.....	29
3.4.3. Structure quaternaire de l'hormone de croissance.....	29
3.5. Récepteurs et signalisation intracellulaire de l'hormone de croissance.....	29
3.5.1. Le récepteur extracellulaire (GH-R).....	29
3.5.2. Les protéines de transport de l'hormone de croissance (GH-BP).....	31
3.5.3. Le mécanisme intracellulaire.....	33
3.5.4. Internalisation des complexes récepteurs-hormones.....	33
3.6. Contrôle de la sécrétion de l'hormone de croissance.....	35
3.6.1. Contrôle par les hormones hypothalamiques hypophysiotropes.....	35
3.6.2. Contrôle par les sécrétagogues (GHRP).....	35
3.6.3. Sécrétion pulsatile de l'hormone de croissance.....	37
3.6.4. Concentrations physiologiques de l'hormone de croissance.....	39
3.7. Mode d'action sur les tissus cibles et effets biologiques associés.....	41
3.7.1. Modalité d'action de l'hormone de croissance sur ses tissus cibles.....	41
3.7.1.1. Sur le foie.....	41
3.7.1.2. Sur la mamelle.....	41
3.7.1.3. Sur l'os.....	43
3.7.1.4. Sur le muscle.....	43
3.7.1.5. Sur le tissu adipeux.....	43
3.7.2. Effets biologiques associés à la stimulation par l'hormone de croissance.....	43
3.7.2.1. Effets directs.....	43
3.7.2.2. Effets indirects via les IGF-I.....	45
3.8. Clairance de la GH.....	49
4. Les hormones recombinantes et leurs utilisations potentielles.....	51
4.1. Historique.....	51
4.2. Synthèse des hormones recombinantes par génie génétique.....	53

4.2.1.	Principe général de synthèse des hormones de croissance recombinantes	53
4.2.2.	Les hormones de croissance recombinantes mises sur le marché.....	55
4.3.	Réglementation.....	55
4.3.1.	Pour le bovin	55
4.3.2.	Pour le porc	57
4.3.3.	Pour le cheval	57
4.3.4.	Pour l'homme.....	59
5.	<i>Administration de GH hétérologue</i>	59
6.	<i>Les animaux génétiquement modifiés</i>	61
7.	<i>Thérapie génique appliquée à la GH</i>	63
8.	<i>Conclusion de la première partie</i>	65
PARTIE - 2	MISE EN ÉVIDENCE DE L'UTILISATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE.....	67
1.	<i>Introduction</i>	67
2.	<i>Matrices biologiques d'intérêt</i>	67
2.1.	Le sang.....	67
2.2.	L'urine	69
3.	<i>Méthodes de détection de l'hormone de croissance</i>	71
3.1.	Méthodes analytiques indirectes	71
3.1.1.	Les bio-essais	73
3.1.2.	Les méthodes immunologiques.....	73
3.1.2.1.	La notion d'anticorps.....	73
3.1.2.2.	Méthodes immunoenzymatiques et radioimmunologiques.....	77
3.1.2.2.1.	Principes	77
3.1.2.2.2.	Application au dosage de la GH	77
3.1.2.3.	Technologie de Résonance Plasmonique de Surface.....	79
3.1.2.4.	Western-Blot.....	79
3.2.	Méthodes analytiques directes.....	81
3.2.1.	Méthodes de purification des protéines	81
3.2.1.1.	Méthodes de précipitation	83
3.2.1.1.1.	Précipitation au sulfate d'ammonium.....	83
3.2.1.1.2.	Précipitation par les solvants organiques.....	85
3.2.1.1.3.	Précipitation par les acides organiques.....	85
3.2.1.2.	Méthodes chromatographiques.....	85
3.2.1.2.1.	Chromatographie basse pression.....	85
3.2.1.2.1.1.	Chromatographie d'affinité	85
3.2.1.2.1.2.	Chromatographie d'échange d'ions.....	87
3.2.1.2.1.3.	Chromatographie d'exclusion stérique.....	87
3.2.1.2.2.	Chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC)	89
3.2.1.3.	Méthodes électrophorétiques.....	91
3.2.1.3.1.	Électrophorèse monodimensionnelle (E1D).....	91
3.2.1.3.2.	Électrophorèse bidimensionnelle (E2D).....	91
3.2.2.	Conditions d'hydrolyse enzymatique appliquées aux GH	93
3.2.3.	Méthodes de détection.....	95
3.2.3.1.	Par ultraviolet (UV).....	95
3.2.3.2.	Par spectrométrie de masse (MS)	95
4.	<i>Méthode de détection des marqueurs biologiques de l'administration de rGH</i>	99

4.1.	L' IGF-1	99
4.1.1.	Mesure des IGF-1 par immuno-essais	99
4.1.2.	Mesure des IGF-1 par spectrométrie de masse.....	101
4.2.	Les IGF Binding Protein (IGFBP)	101
4.3.	Les anticorps anti-hormones de croissance.....	103
4.4.	Autres marqueurs.....	105
5.	<i>Conclusion de la seconde partie</i>	107
CHAPITRE - II MATÉRIEL ET MÉTHODES		109
PARTIE - 1	MATÉRIEL BIOLOGIQUE.....	111
1.	<i>Production d'anticorps polyclonaux anti-reGH chez le lapin</i>	111
2.	<i>Administration d'hormone de croissance à des chevaux de courses</i>	113
2.1.	Voie d'administration et prélèvement des échantillons	113
2.2.	Expérimentation 497 et 498.....	115
2.3.	Expérimentation 563	115
2.4.	Expérimentation 586	117
3.	<i>Références du matériel biologique utilisé</i>	117
PARTIE - 2	MÉTHODES BIOCHIMIQUES DE PURIFICATION DES PROTÉINES	119
1.	<i>Techniques de précipitation</i>	119
1.1.	Précipitation par le sulfate d'ammonium.....	119
1.2.	Précipitation par le méthanol	119
1.3.	Précipitation par l'acide caprylique pour purifier des IgG	119
1.3.1.	Méthode « initiale »	119
1.3.2.	Méthode « miniaturisée »	121
1.3.3.	Purification d'anticorps pour IAC	121
2.	<i>Techniques de concentration</i>	123
2.1.	Concentration par ultrafiltration.....	123
2.1.1.	Exclusion stérique.....	123
2.1.2.	Membrane microspin Vivapure® C ₁₈	123
2.2.	Concentration par évaporation.....	123
3.	<i>Extraction en phase solide (SPE)</i>	125
4.	<i>Chromatographie d'immunoaffinité</i>	125
4.1.	Colonne prégreffée avec IgG anti-bGH.....	125
4.2.	Colonne vierge à greffer.....	127
5.	<i>Techniques de séparations électrophorétiques</i>	127
5.1.	Électrophorèse monodimensionnelle (E1D)	127
5.2.	Électrophorèse bidimensionnelle (E2D).....	129
5.3.	Révélation des protéines.....	131
5.4.	Électroélution de protéines	131
5.5.	Western-Blot	133
6.	<i>Techniques d'hydrolyse enzymatique</i>	133
6.1.	Choix de l'enzyme	133
6.2.	Digestion trypsique en solution.....	135
6.3.	Digestion trypsique « in-gel ».....	135
7.	<i>Techniques de modification chimique des acides aminés in vitro</i>	137

7.1.	Oxydation des méthionines	137
7.2.	Désamidation des asparagines	137
PARTIE - 3	DÉTECTION DES MARQUEURS SECONDAIRES.....	139
1.	<i>Dosage des IGF-1 dans le plasma.....</i>	<i>139</i>
2.	<i>Dosage du cortisol urinaire.....</i>	<i>139</i>
3.	<i>Détection des anticorps anti-hormone de croissance dans le plasma.....</i>	<i>141</i>
3.1.	Détection par Résonance Plasmonique de Surface.....	141
3.1.1.	Préparation de la puce et du récepteur.....	141
3.1.2.	Mécanisme de greffage du récepteur sur la puce : couplage amine.....	141
3.1.3.	Conditions de greffage de reGH	143
3.1.4.	Mise au point des conditions de régénération de la puce	143
3.2.	Détection par ELISA (Figure II-12).....	145
PARTIE - 4	MÉTHODES DE DÉTECTION DIRECTE DE L'HORMONE DE CROISSANCE.....	147
1.	<i>Dosage par RIA.....</i>	<i>147</i>
2.	<i>Détection de reGH par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse.....</i>	<i>149</i>
2.1.	Injection directe.....	149
2.2.	Conditions HPLC	149
2.3.	Conditions de désorption-ionisation.....	149
2.4.	Paramètres de fragmentation MS/MS du peptide N-terminal reGH	151
2.4.1.	MS/MS en utilisant un piège à ions linéaire (LTQ XL).....	151
2.4.2.	MS/MS en utilisant un triple quadripôle (TSQ Quantum Ultra).....	151
CHAPITRE - III	RÉSULTATS ET DISCUSSION	153
PARTIE - 1	MÉTHODES DE DÉPISTAGE DE L'UTILISATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE	155
1.	<i>Les IGF-1</i>	<i>155</i>
1.1.	Dosage des IGF-1	157
1.2.	Justification des concentrations IGF-1 au repos.....	159
2.	<i>Anticorps anti-reGH.....</i>	<i>161</i>
2.1.	Purification d'anticorps à l'acide caprylique	161
2.2.	Mise en évidence d'anticorps anti-reGH par Western-Blot	163
2.3.	Mise en évidence d'anticorps anti-reGH par SPR-BIA	167
2.4.	Mise en évidence d'anticorps anti-reGH par ELISA.....	169
2.4.1.	Optimisation de la méthode.....	169
2.4.1.1.	Le choix du support 96 puits	169
2.4.1.2.	Quantité d'hormone de croissance à greffer.....	171
2.4.1.3.	Choix de la dilution de l'anticorps secondaire et temps de réaction.....	171
2.4.2.	Application du test ELISA mis au point aux échantillons des expérimentations 497 et 498.....	175
2.4.3.	Corrélation des résultats entre méthodes initiale et miniaturisée.....	177
2.4.4.	Suivi longitudinal des contrôles.....	179
2.4.5.	Application de l'ELISA à 615 animaux de routine	181
3.	<i>Conclusion de la première partie</i>	<i>185</i>
PARTIE - 2	MÉTHODES DE DÉTECTION DIRECTES DE L'HORMONE DE CROISSANCE ÉQUINE RECOMBINANTE ..	189
1.	<i>Introduction.....</i>	<i>189</i>
2.	<i>Par radioimmuno-essai (RIA)</i>	<i>191</i>

3.	<i>Par spectrométrie de masse (MS)</i>	195
3.1.	Caractérisation des standards et mise au point des conditions d'acquisition	195
3.1.1.	Les hormones entières.....	195
3.1.1.1.	Par électrophorèse 1D.....	195
3.1.1.2.	Par spectrométrie de masse	195
3.1.2.	Les peptides.....	197
3.1.2.1.	Les peptides utilisés comme standard	197
3.1.2.2.	Les peptides utilisés comme étalons externes.....	201
3.1.2.3.	Mise en évidence de l'oxydation des méthionines du peptide N-terminal reGH.....	203
3.1.2.4.	Mise en évidence de la désamidation de l'asparagine en position 13.....	205
3.1.3.	MS/MS appliquée au peptide N-terminal de reGH.....	205
3.1.4.	LC/MS/MS appliquée au peptide N-terminal de reGH.....	207
3.1.5.	Tests de sensibilité des spectromètres de masse utilisés	207
3.2.	Stratégie analytique envisagée pour la détection directe de reGH dans le plasma	213
3.3.	Optimisation des différentes étapes du protocole de purification de reGH dans le plasma	213
3.3.1.	Détermination des conditions de précipitation au sulfate d'ammonium.....	213
3.3.2.	Évaluation de l'approche SPE dans la stratégie analytique.....	215
3.3.3.	Évaluation de l'approche E2D dans la stratégie analytique	221
3.3.4.	Évaluation de l'approche IAC dans la stratégie analytique.....	223
3.3.5.	Optimisation des conditions d'hydrolyse enzymatique.....	229
3.3.5.1.	Choix de l'enzyme.....	231
3.3.5.2.	Sur standard	231
3.3.5.3.	Sur matrice.....	233
3.3.5.4.	« in-gel ».....	235
3.3.5.5.	Après électroélution des protéines contenues dans le gel d'acrylamide.....	235
3.3.6.	Optimisation du volume de prise d'essai	237
3.3.7.	Optimisation des conditions de concentration des peptides avant leur analyse par LC-MS/MS.....	237
3.3.8.	Protocole final	239
3.4.	Validation de la méthode.....	241
3.4.1.	Quelques définitions	241
3.4.1.1.	La spécificité.....	241
3.4.1.2.	La linéarité.....	241
3.4.1.3.	Limite de décision ($CC\alpha$) et capacité de détection ($CC\beta$).....	241
3.4.2.	Échantillons analysés	243
3.4.3.	Signaux mesurés et choix de l'étalon interne	243
3.4.4.	Échantillons blancs	243
3.4.5.	Droite d'étalonnage.....	243
3.4.6.	Échantillons supplémentés	245
3.4.7.	Limites critiques obtenues.....	245
3.4.8.	Premiers essais de quantification de l'hormone endogène par spectrométrie de masse	247
3.5.	Cinétique d'élimination de la molécule et temps de détection	249
4.	<i>Conclusion de la seconde partie</i>	251
	CONCLUSION GÉNÉRALE.....	255
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	263
	ANNEXES	281

LISTE DES FIGURES

Figure I-1 : principales liaisons et interactions entre biomolécules.....	16
Figure I-2 : représentation schématique de l'hypophyse.....	18
Figure I-3 : représentation du gène codant pour l'hormone de croissance bovine et le polymorphisme L/V en 127.22	
Figure I-4 : structure secondaire en diagramme topographique de l'hormone de croissance.....	24
Figure I-5 : mécanisme de formation des acides isoaspartique et aspartique à partir de l'asparagine.....	26
Figure I-6 : modélisation moléculaire, hGH (résolution : 2,5 Å).....	28
Figure I-7 : hormone de croissance (rouge), liée à son récepteur (dimère vert et bleu).....	30
Figure I-8 : diagramme schématisant les voies de signalisation de l'hormone de croissance dans les cellules cibles (Le Cam et Legraverend, 1993). PL : phospholipases, PC : phosphatidylcholine, P-chol : phosphocholine, DAG : diacylglycérol, AC : adénylate cyclase.	32
Figure I-9 : représentation schématique de l'axe somatotrope.....	34
Figure I-10 : structure de GHRP-6.....	36
Figure I-11 : structure primaire de la Ghrelin humaine.....	36
Figure I-12 : mode d'action de la GH sur ses tissus cibles.....	40
Figure I-13 : processus d'obtention de l'hormone de croissance équine recombinante.....	52
Figure I-14 : les 3 catégories de substances prohibées selon l'article 6 du code des courses.....	58
Figure I-15 : modélisation moléculaire d'une IgG1 humaine.....	72
Figure I-16 : principe physique de la Résonance Plasmonique de Surface.....	78
Figure I-17 : interprétation d'un sensorgramme en fonction des différentes étapes de l'interaction récepteur-ligand	78
Figure I-18 : principe du Western-Blot.....	78
Figure I-19 : schéma des phases d'une stratégie de purification.....	80
Figure I-20 : représentation de l'évolution de la charge nette d'une protéine en fonction du pH.....	82
Figure I-21 : représentation schématique de la modification des groupements ionisables en fonction du pH.....	82
Figure I-22 : principe de la chromatographie d'immunoaffinité.....	84
Figure I-23 : principe de la chromatographie en phase inverse avec une élution par gradient.....	88
Figure I-24 : principe de l'électrophorèse bidimensionnelle.....	90
Figure I-25 : proline formant un coude (90°) dans une protéine.....	94
Figure II-1 : flacon d'EquiGen-5 [®] contenant l'hormone de croissance équine recombinante.....	112
Figure II-2 : prélèvement de sang dans la veine jugulaire (cheval « Palladia »).....	112
Figure II-3 : prélèvement d'urine (cheval « Et Caetera »).....	114
Figure II-4 : dépôt de 260 µL de plasma et le mélange avec 15 µL d'HCl 0,5 M et 25 µL d'acide caprylique dans une microplaque 96 puits de capacité 450 µL à fond conique.....	120
Figure II-5 : mélange par aspiration et refoulement à la pipette multicanaux pour optimiser la précipitation des échantillons de plasma.....	120

<i>Figure II-6 : centrifugation des microplaques à puits coniques recouvertes d'une protection.....</i>	<i>120</i>
<i>Figure II-7 : système de deux VacElut couplés utilisé lors de la thèse : (a) cartouches, (b) support, (c) manomètre, (d) trompe à eau, (e) pompe à vide électrique</i>	<i>124</i>
<i>Figure II-8 : représentation graphique des différentes tensions appliquées au « strip » lors de l'étape de réhydratation active et de l'étape de focalisation des protéines (Protean IEF Cell).....</i>	<i>128</i>
<i>Figure II-9 : schéma d'une des 6 parties du module d'électroéluion de protéines.....</i>	<i>130</i>
<i>Figure II-10 : activation du carboxyméthyl dextran avec le mélange EDC/NHS.....</i>	<i>140</i>
<i>Figure II-11 : couplage amine d'un ligand sur la surface activée de la puce</i>	<i>140</i>
<i>Figure II-12 : description du fonctionnement du test ELISA de détection des anticorps anti-reGH.....</i>	<i>144</i>
<i>Figure III-1 : concentrations en IGF-1 plasmatiques déterminées par ELISA, J_{.7} à J₊₃₀ cheval 497 (a), cheval 498 (b) et superposition des deux courbes obtenues (c). Les flèches de couleur désignent les posologies d'EquiGen-5[®] administrées, rouge (18 µg/kg), vert (28 µg/kg) et rose (30 µg/kg). Le trait en pointillé représente le seuil en IGF-1 proposé à 860 ng.mL⁻¹.....</i>	<i>156</i>
<i>Figure III-2 : superposition des courbes de dosage du cortisol urinaire obtenues par LC/MS pour les deux chevaux (J_{.7} à J₊₃₀). Les flèches de couleur désignent les posologies d'EquiGen-5 administrées, rouge (18 µg/kg), vert (25 µg/kg) et rose (30 µg/kg).....</i>	<i>158</i>
<i>Figure III-3 : SDS-PAGE représentant l'abondance de protéines dans le sérum purifié à l'acide caprylic et le sérum total (cheval 498). 14 µg de protéines de chacun des échantillons (J_{.7}, J₊₁₅, J₊₁₈₀) ont été séparés par électrophorèse dans un gel d'acrylamide 6 % en condition non réductrice. Gel coloré au bleu de Coomassie.....</i>	<i>160</i>
<i>Figure III-4 : recherche d'anticorps anti-reGH par Western-Blot (Palladia). Révélation réalisée à l'aide d'anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) de chevaux, marqués à la phosphatase alcaline, substrat NBT/BCIP.....</i>	<i>164</i>
<i>Figure III-5 : recherche d'anticorps anti-reGH par Western-Blot (Grandet). Révélation réalisée à l'aide d'anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) de chevaux, marqués à la phosphatase alcaline, substrat NBT/BCIP.....</i>	<i>164</i>
<i>Figure III-6 : sensorgramme du couplage amine de reGH sur puce CM5 (Biacore[®] Q) dans les conditions mises au point. La quantité immobilisée correspond à un signal de 5985 RU.....</i>	<i>166</i>
<i>Figure III-7 : cinétique de production des anticorps anti-reGH obtenue à partir des échantillons sériques du cheval 497 mesurée par SPR-BIA et appliqué sur le canal reGH greffé (Fc1) et sur le canal contrôle (Fc2). Le graphique montre les résultats Fc1 – Fc2 obtenus pour les échantillons collectés de J_{.7} à J₊₂₁₀. La valeur seuil est présentée en pointillés (15 RU).....</i>	<i>168</i>
<i>Figure III-8 : optimisation de la quantité de reGH à fixer dans les puits de la plaque MaxiSorp. Essais réalisés avec 10 concentrations (0,01 à 10 µg/puits). Chaque contrôle (C+ : J₊₂₂, 498) et (C- : J_{.2}, 498) a été testé avec une dilution au 1/8000 et au 1/10000 de l'anticorps secondaire. Réactions suivies à 405 nm pendant 80 minutes à 37°C.</i>	<i>170</i>
<i>Figure III-9 : optimisation de la quantité d'anticorps secondaire à ajouter pour obtenir l'écart le plus important entre les contrôles. 500 ng/puits de reGH sont fixés. Chaque contrôle (C+ : J₊₂₂, 498) et (C- : J_{.2}, 498) a été testé avec une dilution au 1/6000, 1/8000, 1/10000 et 1/20000 de l'anticorps secondaire. Réactions suivies à 405 nm pendant 95 minutes à 37°C avec relevé des DO toutes les 15 minutes.....</i>	<i>170</i>

<i>Figure III-10 : cinétiques de production des anticorps anti-reGH obtenues à partir des échantillons sériques et plasmatiques J₋₇ à J₊₃₀ (a : cheval 497 ; b : cheval 498) mesurée par ELISA à 405 nm sur des plaques revêtues de reGH et sur une plaque revêtue d'insuline porcine. La valeur seuil est présentée en pointillés (DO = 1,2).</i>	<i>174</i>
<i>Figure III-11 : cinétiques de production des anticorps anti-reGH obtenues à partir des échantillons sériques J₋₇ à J₊₂₁₀ (chevaux 497 et 498) mesurée par ELISA à 405 nm sur des plaques revêtues de reGH et sur une plaque revêtue d'insuline porcine. La valeur seuil est présentée en pointillés (DO = 1,2).</i>	<i>176</i>
<i>Figure III-12 : comparaison des cinétiques de production des anticorps anti-reGH obtenues à partir de la méthode initiale, de la méthode de précipitation des échantillons à l'acide caprylique en microplaque avec des lavages manuels et de la méthode de précipitation des échantillons à l'acide caprylique en microplaque avec des lavages automatiques. Mesure réalisée par ELISA à 405 nm sur des plaques revêtues de reGH. Échantillons plasmatiques (J₋₇ à J₊₃₀, 497).</i>	<i>176</i>
<i>Figure III-13 : suivi longitudinal des contrôles positifs et négatifs appliqués lors de la réalisation des ELISA.</i>	<i>178</i>
<i>Figure III-14 : mise en évidence de la production des d'anticorps sériques anti-reGH par ELISA après incubation. Échantillons J₋₇ à J₊₂₁₀ (cheval 497).</i>	<i>178</i>
<i>Figure III-15 : dépistage de l'exposition des chevaux de courses à l'hormone de croissance équine recombinante. 615 plasmas de routine précipités à l'acide caprylique et testés en aveugle sur la plaque ELISA revêtue de reGH pour mettre en évidence des anticorps anti-reGH dans ces échantillons.</i>	<i>180</i>
<i>Figure III-16 : concentrations totales (eGH + reGH) déterminées par RIA, J₊₁ à J₊₃₀ cheval 497 (a), cheval 498 (b) et superposition des deux courbes obtenues (c). Les concentrations obtenues pour les jours avant traitement J₋₇ à J₋₁ sont foncées. Les flèches de couleur désignent les posologies d'EquiGen-5[®] administrées rouge (18 µg/kg), vert (25 µg/kg) et rose (30 µg/kg). Le trait en pointillé représente la quantité maximale d'eGH mesurée pendant une semaine avant le traitement.</i>	<i>190</i>
<i>Figure III-17 : expérimentation 563, concentrations plasmatiques de reGH déterminées par RIA pendant 3 heures après une injection d'EquiGen-5[®] à la dose de 25 µg/kg avec inhibition de la production endogène de GH par l'octréotide. L'effet de l'octréotide seule sur la production endogène d'eGH a été évaluée sur ce même animale un jour avant aux mêmes heures (courbe orange).</i>	<i>192</i>
<i>Figure III-18 : gels d'électrophorèse monodimensionnels (4-12%). Trois microgrammes de standards d'hormones de croissance naturelles et recombinantes équine, bovine ont été utilisés. Mise en évidence de la contamination de lots de pGH sigma par de la prolactine porcine. Coloration Biosafe coomassie blue.</i>	<i>194</i>
<i>Figure III-19 : spectres de masse des enveloppes protéiques de l'hormone de croissance équine (eGH) et recombinante équine (reGH) obtenues après injection directe dans le spectromètre de masse en ionisation ESI-(+) et détection QqQ. Les multiples états de charge des enveloppes protéiques obtenues sont reportés sur la figure. ..</i>	<i>194</i>
<i>Figure III-20 : enveloppes protéiques de l'hormone de croissance porcine et de la prolactine contenues dans le mélange et obtenues après injection directe dans le spectromètre de masse en ionisation ESI-(+) et détection par un piège à ions 3D en mode « turboscan ». Les multiples états de charge des enveloppes protéiques sont reportés sur la figure.</i>	<i>196</i>
<i>Figure III-21 : spectres de masse des peptides de synthèse correspondant aux peptides N-terminaux après hydrolyse trypsique d'eGH et de reGH obtenus après injection directe dans le spectromètre de masse en ionisation ESI (+) et détection par un piège à ions 3D. Les différents adduits sont reportés sur la figure.</i>	<i>198</i>

<i>Figure III-22 : spectres de masse de mélange 50:50 de peptides N-terminaux de synthèse marqués et non marqués correspondant à l'hydrolyse trypsique d'eGH et de reGH obtenus après injection directe dans le spectromètre de masse en ionisation ESI-(+) et détection par un piège à ions 3D en mode « zoomscan ». Les différents adduits sont reportés sur la figure.....</i>	<i>199</i>
<i>Figure III-23 : chromatogramme d'ions de la séparation par RP-HPLC et détection par spectrométrie de masse du peptide N-terminal de reGH (TR = 13,6 min) et de l'étalon externe eGH(¹³C)₃, en (a) et du peptide N-terminal de reGH (TR = 7,7 min) et de l'étalon externe A (TR = 6,2 min) en (b).....</i>	<i>200</i>
<i>Figure III-24 : spectres de masse de l'oxydation du peptide N-terminal reGH par H₂O₂ au bout de 2 min et 15 min de contact. Résultats obtenus après injection directe dans le spectromètre de masse en ionisation ESI (+) et détection par un piège à ions 3D en mode zoomscan. Les différentes formes sont reportées sur la figure.</i>	<i>202</i>
<i>Figure III-25 : RP-HPLC/MS/MS du peptide N-terminal caractéristique de reGH obtenu après hydrolyse trypsique d'un standard vieilli pendant 4 mois à 4°C à pH 7,9. Gradient composé d'H₂O/ACN 0,2 % AF au moyen d'une colonne C4, 300Å, 2x250 mm, 5 µm couplé à un piège à ions linéaire (LTQ XL). 2 transitions de m/z 933,5 suivies en balayant entre m/z 793,5 à 795,5 et m/z 1287 à 1290.....</i>	<i>204</i>
<i>Figure III-26 : ions fragments b et y théoriques du peptide N-terminal reGH.....</i>	<i>206</i>
<i>Figure III-27 : spectre de masse représentant la fragmentation du peptide N-terminal reGH (m/z 933,5) avec une énergie de collision de 45 eV sur QqQ.....</i>	<i>206</i>
<i>Figure III-28 : structure des ions fragments majoritaires du peptide N-terminal de reGH. Mise en évidence des ions y₁₅ et y₁₂.</i>	<i>208</i>
<i>Figure III-29 : chromatogramme d'ions représentant 3 transitions suivies après fragmentation du peptide standard N-terminal à 45 eV en (a) suivi du standard N-terminal (14,63 min), en (b) suivi du peptide après trypsinolyse de reGH (14,53 min).....</i>	<i>208</i>
<i>Figure III-30 : chromatogramme d'ions représentant 1 pg de peptide N-terminal de reGH standard détecté par RP-HPLC/MS/MS au moyen d'un piège à ions linéaire (LTQ XL). Acquisition en mode product scan de l'ion m/z 933,3 et reconstruction du chromatogramme d'ions avec les ions m/z 578,3, m/z 794,5, m/z 1287,5, m/z 1288,5.</i>	<i>209</i>
<i>Figure III-31 : schéma du principe de la stratégie analytique envisagée pour la détection directe de reGH dans le plasma au moyen de son peptide N-terminal caractéristique.</i>	<i>212</i>
<i>Figure III-32 : courbe représentant l'effet de différents pourcentages de saturation en sulfate d'ammonium sur la détection de reGH dans le plasma avec une prise d'essai de 3 mL à une concentration de [reGH] = 50 ng.mL⁻¹. Détection du peptide N-terminal de reGH par spectrométrie de masse en mode product scan (LTQ XL).....</i>	<i>214</i>
<i>Figure III-33 : dosage des protéines contenue dans 2,5 mL de plasma servant de prise d'essai (1), après 50 % de saturation en sulfate d'ammonium, le culot de protéines et celles contenues dans le surnageant sont dosées par la méthode de Lowry.....</i>	<i>214</i>
<i>Figure III-34 : chromatogrammes d'ions du peptide N-terminal de reGH, détecté dans un ajout de plasma à 100 µg.L⁻¹ de reGH après une précipitation à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium, une SPE C4 et une trypsinolyse avant LC-MS (QqQ).....</i>	<i>216</i>
<i>Figure III-35 : chromatogrammes d'ions représentant la détection du peptide N-terminal de reGH après précipitation à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium, SPE C4 et trypsinolyse d'un ajout dans le plasma de</i>	

<i>reGH</i> à 10 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Détection de deux transitions en mode Selected Reaction Monitoring (SRM) et une fragmentation en série en mode Consecutive Reaction Monitoring (CRM).....	216
Figure III-36 : électrophorégramme bidimensionnel obtenu après dépôt de 3 μg de <i>reGH</i> sur un IPG-strip de pH 5-8 suivi d'une isoélectrofocalisation, migration SDS page et révélation au Bio-Safe Coomassie blue.....	220
Figure III-37 : Western-Blot réalisés à partir des deux anticorps Affiland anti-bGH et anti-eGH à disposition pour réaliser la chromatographie d'immunoaffinité. 1,5 μg d'hormone par puit.	224
Figure III-38 : chromatogramme d'ions représentant la détection du peptide N-terminal résultant de la digestion enzymatique de 6 μg de <i>reGH</i> éluées après une colonne prégreffée par Affiland avec anticorps anti-bGH. Elution avec 250 mM NaCl, 25mM NaOH, 10% ACN.....	226
Figure III-39 : chromatogramme d'ions du peptide N-terminal de <i>reGH</i> dans un ajout de 100 ng.mL^{-1} de <i>reGH</i> dans le plasma. Purification de la <i>reGH</i> par immunoaffinité avec des anticorps anti-bGH Affiland greffés sur une colonne Amersham NHS-activée. Elution par 70/30 éthanol eau en tampon acétate 0,2 M pH 5,6.....	226
Figure III-40 : production du peptide N-terminal <i>reGH</i> pendant 24h à température ambiante. L'arrêt de l'agitation pendant la période nocturne a eu un impact sur le rendement d'hydrolyse enzymatique.....	232
Figure III-41 : optimisation de la quantité de trypsine « sequence grade » à ajouter à l'échantillon de plasma 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ extrait pour obtenir la détection du peptide N-terminal de <i>reGH</i> la plus importante. Les échantillons identiques ont été extraits en même temps, seule la quantité de trypsine ajoutée est différente.	232
Figure III-42 : chromatogramme d'ions correspondant au suivi du peptide N-terminal <i>reGH</i> par LC-ESI-(+)-MS après digestion « in-gel » (933,3 > 933,3).....	234
Figure III-43 : optimisation du volume de prise d'essai de plasma pour obtenir la détection la plus importante du peptide N-terminal de <i>reGH</i>	236
Figure III-44 : abondances relatives du peptide N-terminal de <i>reGH</i> obtenues après purification (sulfate d'ammonium, SPE, trypsinolyse) de 8 plasmas identiques à 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en utilisant différentes conditions de concentrations des peptides tryptiques avant leur détection en LC-MS/MS. Ref1 et ref2 sont 2 échantillons évaporés sous flux d'azote à 48 °C et les autres présentent différentes conditions de mélange H ₂ O/ACN ou H ₂ O/iProp utilisées pour éluer les échantillons en microspin C18.....	236
Figure III-45 : schéma du principe de la détection directe de <i>reGH</i> dans le plasma par détection de son peptide N-terminal caractéristique.....	238
Figure III-46 : chromatogramme d'ions d'un ajout de <i>reGH</i> à 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans le plasma dans lequel apparaît la détection RP-HPLC/MS/MS en mode « balayage des ions produits » du peptide N-terminal de <i>reGH</i> (m/z 933,5), l'étalon interne (peptide N-terminal de <i>rbGH</i> , m/z 913) et le peptide N-terminal d' <i>eGH</i> (m/z 868) présent naturellement dans le plasma servant à réaliser la validation. Détection via un gradient composé d'H ₂ O/ACN 0,2 % AF et une colonne C4, 300Å, 2x250 mm, 5 μm couplée à un piège à ions linéaire (LTQ XL).	246
Figure III-47 : gamme de concentration de <i>reGH</i> dans le plasma (1 à 40 ng.mL^{-1}) obtenue par LC-MS/MS (piège à ions linéaire).....	248
Figure III-48 : cinétique d'élimination de <i>reGH</i> dans le plasma après une seule injection (expérimentation 586). Dosage de l'hormone de croissance équine recombinante par LC-MS/MS (piège à ions linéaire). Dernier point détecté à 15h30.....	248

Figure III-49 : chromatogramme d'ions de la détection du peptide N-terminal de reGH dans le plasma après 48 heures. Détection par LC-MS/MS au moyen d'un triple quadripôle (TSQ Quantum Ultra). Suivi de m/z 933,4 > 794,4 + 1287,9 + 1288,9..... 250

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau I-1 : les quatres isoformes de la bGH (AA : acides aminés).....</i>	<i>22</i>
<i>Tableau I-2 : homologie de séquence entre bGH et GHs d'autres espèces, en ne tenant compte que de l'isoforme majoritaire pour chacune des espèces.</i>	<i>22</i>
<i>Tableau I-3 : structure primaire de l'hormone de croissance pour 8 espèces animales avec leur pourcentage d'identité par rapport à l'hormone équine endogène</i>	<i>24</i>
<i>Tableau I-4 : tableau des isoformes de l'hormone de croissance humaine, 15 min après une sécrétion.....</i>	<i>28</i>
<i>Tableau I-5 : concentrations physiologiques de GH telles que rapportées dans la littérature pour le cheval, l'homme, le porc et le bovin</i>	<i>38</i>
<i>Tableau I-6 : hormones de croissance disponibles sur le marché, fournisseurs et différences entre les formes naturelles et recombinantes en tenant compte principalement de la partie N-terminale des molécules.....</i>	<i>54</i>
<i>Tableau I-7 : méthodes d'incorporation de la GH en thérapie génique</i>	<i>62</i>
<i>Tableau I-8 : classe de protéines et pourcentages associés en fonction des espèces (Gautier, 1979).....</i>	<i>68</i>
<i>Tableau I-9 : composition des différents minéraux constituant l'urine équine normale.....</i>	<i>70</i>
<i>Tableau I-10 : exemples d'application de bio-essais appliqués à la GH.....</i>	<i>70</i>
<i>Tableau I-11 : méthodes immunologiques de mesure de la GH dans différentes matrices biologiques rapportées dans la littérature pour le cheval, l'homme, le porc et le bovin</i>	<i>76</i>
<i>Tableau I-12 : étapes de purification utilisant le sulfate d'ammonium.....</i>	<i>82</i>
<i>Tableau I-13 : conditions d'(immuno)affinité appliquées à la purification des GH.....</i>	<i>84</i>
<i>Tableau I-14 : méthodes chromatographiques recensées pour isoler la GH d'un milieu complexe.....</i>	<i>86</i>
<i>Tableau I-15 : Caractéristiques des phases les plus utilisées en analyse des protéines/peptides :.....</i>	<i>88</i>
<i>Tableau I-16 : tableau présentant les conditions de séparation en HPLC des hormones de croissance ou de leurs peptides.....</i>	<i>90</i>
<i>Tableau I-17 : conditions d'hydrolyse trypsique appliquée aux GH</i>	<i>92</i>
<i>Tableau I-18 : longueurs d'onde utilisées en spectroscopie UV pour détecter de l'hormone de croissance entière ou ses peptides pour l'homme, le porc, le bovin et l'équin</i>	<i>94</i>
<i>Tableau I-19 : présentation des modes d'ionisation et analyseurs de masse utilisés pour l'étude des GH</i>	<i>96</i>
<i>Tableau II-1 : références et caractéristiques des lapins utilisés pour obtenir des anticorps polyclonaux.....</i>	<i>110</i>
<i>Tableau II-2 : tableau récapitulatif des prélèvements et injections réalisés sur les lapins</i>	<i>110</i>
<i>Tableau II-3 : caractéristiques des chevaux choisis pour revoir le traitement à l'hormone de croissance équine recombinante injectée par voie sous-cutanée.....</i>	<i>114</i>
<i>Tableau II-4 : volume de solution d'EquiGen-5[®] et quantités de reGH injectés par cheval.....</i>	<i>114</i>
<i>Tableau II-5 : caractéristiques du cheval choisi pour définir la cinétique d'élimination de l'hormone de croissance équine recombinante après une injection par voie sous-cutanée.....</i>	<i>116</i>
<i>Tableau II-6 : volumes de solution et quantités d'EquiGen-5[®] et de Sandostatine[®] administrés au cheval « Raft Song » pour déterminer la cinétique d'élimination de reGH avec inhibition de la production endogène d'eGH....</i>	<i>116</i>

<i>Tableau II-7 : différents pourcentages de saturation en sulfate d'ammonium pour un volume de prises d'essai de plasma fixé à 3 mL.....</i>	<i>118</i>
<i>Tableau II-8 : nom, références et caractéristiques des différentes cartouches SPE testées pour mettre au point la méthode de détection directe de reGH dans le plasma.....</i>	<i>124</i>
<i>Tableau II-9 : composition des gels d'acrylamide à 4, 6, 8 et 12 % utilisés lors des séparations électrophorétiques de protéines.....</i>	<i>126</i>
<i>Tableau II-10 : composition du tampon permettant de solubiliser les protéines et permettant une réhydratation active optimale du « strip ».....</i>	<i>128</i>
<i>Tableau II-11 : composition du tampon d'équilibration du strip préliminaire à la seconde dimension (SDS-PAGE).....</i>	<i>130</i>
<i>Tableau II-12 : gradient HPLC utilisé pour le dosage du cortisol urinaire.....</i>	<i>140</i>
<i>Tableau II-13 : composition du gradient d'élution utilisé avec la colonne Interchim (C₄, 2 x 250 mm, 300 Å, 5 µm) pour la caractérisation par spectrométrie de masse du peptide N-terminal caractéristique de reGH.....</i>	<i>148</i>
<i>Tableau II-14 : conditions de désorption-ionisation des peptides N-terminaux de GH (LCQ DECA).....</i>	<i>148</i>
<i>Tableau II-15 : conditions de désorption-ionisation des peptides N-terminaux de GH (Quattro).....</i>	<i>148</i>
<i>Tableau II-16 : conditions de désorption-ionisation des peptides N-terminaux de GH (LTQ XL).....</i>	<i>148</i>
<i>Tableau II-17 : conditions de désorption-ionisation des peptides N-terminaux de GH (TSQ Quantum Ultra).....</i>	<i>148</i>
<i>Tableau II-18 : paramètres de détection des ions appliqués aux peptides N-terminaux reGH, eGH et rbGH en mode « balayage des ions produits », en mode « selected reaction monitoring » (SRM), en mode « consecutive reaction monitoring » (CRM) obtenus avec le piège à ions linéaire (LTQ XL).....</i>	<i>150</i>
<i>Tableau III-1: concentrations en protéines dans le plasma et le sérum avant et après la précipitation des protéines à l'acide caprylique obtenues par dosage protéique selon la méthode de Folin-Lowry. Chaque échantillon a été quantifié quatre fois.</i>	<i>160</i>
<i>Tableau III-2: résultats du travail de mise au point correspondant aux conditions d'immobilisation de reGH sur une puce de type CM5 ainsi que les conditions de régénération de l'interaction anticorps-reGH élaborées.....</i>	<i>166</i>
<i>Tableau III-3: applications théoriques des supports PolySorp et MaxiSorp pour l'adsorption de biomolécules....</i>	<i>168</i>
<i>Tableau III-4 : temps de détection des animaux traités par EquiGen-5 au moyen de différentes méthodes de dépistage : dosage de la concentration en IGF-1 plasmatique, détection des anticorps anti-reGH par Résonance Plasmonique de Surface (SPR) et par ELISA.....</i>	<i>184</i>
<i>Tableau III-5: masses théoriques et expérimentales des hormones de croissance équine et porcine, recombinante équine et mise en évidence de la prolactine porcine obtenues par spectrométrie de masse.....</i>	<i>196</i>
<i>Tableau III-6 : étalons externes du peptide N-terminal de reGH potentiellement utilisables en spectrométrie de masse. Présentation des différentes séquences choisies, leur nombre d'acide aminé et leur indice d'hydrophobicité selon l'indice de Kyte et Doolittle.....</i>	<i>200</i>
<i>Tableau III-7 : rapport m/z des formes oxydées du peptide N-terminal reGH.....</i>	<i>204</i>
<i>Tableau III-8 : bilan des ions fragments théoriques obtenus après MS/MS du peptide N-terminal reGH.....</i>	<i>206</i>
<i>Tableau III-9 : tableau des rapports d'ions après LC-MS/MS de l'ion 933.....</i>	<i>209</i>

<i>Tableau III-10 : nom, caractéristiques et rendements obtenus à partir des différentes cartouches SPE testées pour mettre au point la méthode de détection directe de reGH dans le plasma.....</i>	<i>214</i>
<i>Tableau III-11 : types de colorations plus sensibles que le Biosafe coomassie blue, disponibles sur le marché et compatibles avec la spectrométrie de masse.....</i>	<i>220</i>
<i>Tableau III-12 : Productions de peptides in silico à partir de l'hormone de croissance équine recombinante (reGH).....</i>	<i>230</i>
<i>Tableau III-13 : caractéristiques des peptides N-terminaux théoriquement produits par trypsinolyse des hormones de croissance eGH, reGH, pGH, rpGH, bGH et rbGH :</i>	<i>230</i>
<i>Tableau III-14 : tableau de synthèse des paramètres de la validation obtenus (n = 20).....</i>	<i>244</i>
<i>Tableau III-15 : concentrations en hormone de croissance équine naturellement présentes dans les 20 plasmas d'animaux sains ayant servis lors de la validation de la méthode.....</i>	<i>246</i>

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Ag - Ac:	Complexes antigènes - anticorps
ACN :	Acétonitrile
ADN :	Acide désoxyribonucléique
APCI :	Ionisation chimique à pression atmosphérique
ARNm:	Acide ribonucléique messager
AF :	Acide Formique
CC α :	Limite de décision
CC β :	Capacité de détection
CID :	Dissociations induites par collision (Collision Induced Dissociations)
CRM :	Consecutive Reaction Monitoring
E1D, E2D :	Electrophorèse monodimensionnelle et bidimensionnelle
ELISA :	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPAB :	EDTA Pepstatine Ammonium Bicarbonate
ESI :	Electrospray
GH :	Growth Hormone (b : bovine, c : canine, e : équine, h : humaine, p : porcine)
GH-BP :	Growth Hormone Binding Protein
GHRH:	Growth Hormone Releasing Hormone = somatolibérine
GHRP :	Growth Hormone Releasing Peptide = sécrétagogues
HPLC, LC :	High Performance Liquid Chromatography
HR-MS :	Spectrométrie de masse haute résolution (High Resolution Mass Spectrometry)
IAC :	Chromatographie d'immunoaffinité (ImmunoAffinity Column)
IGF-1 :	Insulin-like Growth Factor 1
IGF-BP:	Insulin-like Growth Factor – Binding Protein
IgG :	Immunoglobuline G
iProp :	Isopropanol
IRMS :	Isotopic Ratio Mass Spectrometry
LC-MS/MS :	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LMR :	Limite maximale de résidus
MALDI :	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MeOH :	Méthanol
MRM :	Suivi de réactions multiples (Multiple Reaction Monitoring)

MS	:	Spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)
MS/MS, MS ⁿ	:	Spectrométrie de masse en tandem
NBT/BCIP	:	Nitro blue tetrazolium chloride 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate toluidine
NHS	:	N-Hydroxy-Succinimide
PAL	:	Phosphatase Alcaline
pI	:	Point Isoélectrique
PM	:	Poids Moléculaire
rGH	:	recombinant Growth Hormone
RIA	:	RadioImmunoAssay
SDS-PAGE	:	Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SIM	:	Single Ion Monitoring
SPE	:	Extraction sur phase solide (Solid Phase Extraction)
SPR-BIA	:	Surface Plasmon Resonance – Biosensor ImmuoAssay
ST	:	Somatotropine
TFA	:	Acide trifluoroacétique

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'hormone de croissance (GH : growth hormone) a été décrite pour la première fois en 1921 par Evans et Long, de l'Université de Californie, comme molécule capable de promouvoir la croissance. Leurs premières études ont montré qu'après administration d'extraits bruts d'hypophyse de bovins à des rats en croissance, leur vitesse de croissance en était accélérée. Ces extraits hypophysaires ont été appelés « somatotropine » (ST) en lien avec le grec signifiant « croissance de tissu ». En raison de cette appellation très ancienne, le mot somatotropine est toujours couramment utilisé pour définir l'hormone de croissance. Par la suite, en 1937, Asimov et Krouse démontraient l'effet galactopoïétique d'extraits bruts hypophysaires bovins injectés à des vaches en lactation. Mais ce n'est qu'en 1944 que Li et Evans décrivent brièvement le premier protocole de purification d'hormones de croissance à partir d'extraits bruts d'hypophyse bovine pour publier un protocole complet en 1945. Peu après, en 1958, Raben entreprit de traiter le nanisme hypophysaire en injectant de l'hormone somatotrope humaine extraite d'hypophyses à des patients.

Rapidement le besoin en hormone de croissance s'est accru pour soigner le retard de croissance d'enfants. Pour satisfaire à la demande, l'hormone de croissance humaine (hGH) a été obtenue par prélèvement d'hypophyses humaines sur des cadavres dont les origines étaient assez peu vérifiées. C'est en juin 1985, après l'évaluation du risque de contamination de lots de hGH par le prion de la maladie de Creutzfeldt-Jacob, que des pays comme la grande Bretagne et les Etats-Unis ont mis en place la synthèse d'hormone de croissance humaine recombinante à grande échelle pour pouvoir arrêter progressivement de distribuer les produits pharmaceutiques provenant d'hypophyses humaines. Après le décès de plusieurs enfants traités avec de la hGH contaminée, l'intérêt de produire des hormones par biotechnologie en toute innocuité s'est très vite imposé. Dans le même temps, les avancées scientifiques rapides dans le domaine humain ont permis à l'industrie pharmaceutique de développer et de mettre sur le marché des spécialités d'hormones de croissance recombinantes (rGH) bovines, équine et porcines.

Simultanément à la mise sur le marché de ces molécules pour les espèces animales bovine, porcine et équine, une réglementation interdisant leur emploi est apparue en Europe opposée à celle des Etats-Unis où l'autorisation a été accordée par la Food and Drug Administration (FDA) afin d'accroître la production de lait des vaches laitières. Dans ce contexte international, la circulation des hormones de croissance sur le marché noir Européen est suspectée pour accroître la rentabilité de production des animaux d'élevage et améliorer les performances des chevaux participants aux courses hippiques en dépit des directives Européennes en vigueur et du Code des Courses.

Depuis la mise sur le marché de ces molécules, aucune méthode directe fiable d'identification des rGH, présentes à l'état de trace dans les fluides biologique, n'a été élaborée pour vérifier la bonne application de la réglementation.

Confrontés à ce problème, dès la fin des années 90, des recherches ont été initiées d'une part par le Laboratoire des Courses Hippiques (LCH) et d'autre part par le Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) de l'École Nationale Vétérinaire de Nantes pour permettre la détection directe de l'administration frauduleuse d'hormone de croissance (GH) à des animaux, respectivement chez le cheval et les animaux de production. Le Laboratoire des Courses Hippiques est le laboratoire agréé de la Fédération Nationale des Courses Françaises dont l'activité principale est l'analyse des échantillons biologiques équins pour la recherche des substances prohibées par le Code des Courses (stéroïdes anabolisants, anti-inflammatoires non stéroïdiens, diurétiques...). Le laboratoire est accrédité ISO 17025 pour la prestation d'analyse depuis 1997 par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC). Le Laboratoire d'Analyse des Résidus et Contaminants dans les Aliments est un laboratoire public placé sous la tutelle de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) du Ministère de l'Agriculture et de la pêche (MAP) et est également, depuis 1995, une Unité Propre en Soutien de Programme (UPSP) de la Direction Générale de l'Enseignement et de la Recherche (DGER) du MAP. Depuis 2003, le LABERCA est contractualisé avec le département Alimentation Humaine (AlimH) de l'Institut National de la Recherche Agronomique. Depuis 1995, le LABERCA est accrédité ISO 17025 pour la prestation d'analyse champ flexible de type B depuis 2006 et certifié selon le référentiel iso 9001:2000 depuis 2003 pour la « conception, la conduite et la valorisation des projets de recherche ».

Les travaux préliminaires de détection directe de l'administration frauduleuse d'hormones de croissance recombinantes effectués au sein de ces laboratoires ont permis de poser les premières pierres de l'élaboration de techniques de spectrométrie de masse sans pour autant aboutir à une méthode performante de détection directe fiable des rGH en milieu complexe. Ces tentatives n'avaient pas abouti, vraisemblablement en raison de l'utilisation de spectromètres de masse moins sensibles et spécifiques que ceux disponibles actuellement. Il est indéniable que les évolutions récentes de ces appareils permettent de réaliser de la MSⁿ ou de la HR-MS en atteignant des sensibilités de détection qu'il n'était pas possible d'envisager il y a encore tout juste 3 ans.

C'est en 2004, devant l'urgence d'établir une méthode de détection directe, que ces deux laboratoires ont décidé de mettre en commun leurs moyens et compétences pour résoudre ce problème majeur, touchant à la fois le monde des courses hippiques et la sécurité sanitaire des aliments. Le travail de thèse est plus particulièrement focalisé sur la détection de l'administration frauduleuse de l'hormone de croissance équine recombinante (reGH) à des chevaux de courses.

En premier lieu, ce manuscrit fait le point sur les données de la littérature et est consacré à l'état des connaissances actuelles sur la structure, les effets biologiques, les méthodes de purification et de détection des hormones de croissance et plus particulièrement pour les espèces présumées concernées par le dopage à la rGH : humaine, bovine et équine. Le deuxième chapitre est consacré à la description des matériels et méthodes employés au cours de ce travail pour mettre au point les méthodes de détection de l'administration frauduleuse d'hormone de croissance ainsi que la description des protocoles expérimentaux d'administration de l'hormone de croissance aux chevaux réformés de courses.

Le troisième chapitre expose les résultats des recherches effectuées dans le cadre de ce travail de thèse : les molécules de GH et rGH sont recherchées à l'état de traces dans les matrices biologiques de composition très complexe c'est-à-dire à une concentration de l'ordre du ng.mL^{-1} (ppb). Le développement analytique a consisté tout d'abord à extraire la molécule de la matrice, puis à purifier l'extrait obtenu, et enfin à détecter et identifier de façon non ambiguë la molécule cible par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) pour permettre une bonne spécificité et une grande sensibilité de détection. En parallèle du développement de cette méthode, un test ELISA a été développé pour permettre la détection indirecte de l'administration d'hormone de croissance à des chevaux grâce à une mesure de la quantité d'anticorps anti-GH produits en conséquence du traitement.

L'ensemble de ces travaux a donné lieu aux publications ou communications suivantes :

PUBLICATIONS

Bailly-Chouriberry L, Chu-Van E, Pinel G, Garcia P, Popot MA, André-Fontaine G, Bonnaire Y and Le Bizec B. Detection of secondary biomarker of met-eGH as a strategy to screen for somatotropin misuse in horseracing. *Analyst* 2008;133(2):270-276.

Bailly-Chouriberry L, Pinel G, Garcia P, Popot MA, Bonnaire Y and Le Bizec B. Elimination kinetic of recombinant equine growth hormone (reGH) in horse plasma by LC-MSⁿ (linear trap) measurements. En cours de soumission en Novembre 2007.

COMMUNICATIONS ORALES

Bailly-Chouriberry L, Pinel G, Garcia P, Popot MA, Bonnaire Y et Le Bizec B. Détection de l'administration d'hormone de croissance équine recombinante par LC-ESI-MSⁿ : application au contrôle de son usage illégal. Forum labo, 28-30 mars 2006, Paris.

Bailly-Chouriberry L, Pinel G, Garcia P, Popot M-A, Bonnaire Y, André F and Le Bizec B. Growth hormone abuse in food production animals and horseracing : new analytical strategies to demonstrate the misuse. Giessen-Nantes Twinning, ENVN, 21 avril 2006.

Bailly-Chouriberry L, Pinel G, Le Bizec B, Garcia P, Popot MA et Bonnaire Y. Détection de l'administration d'hormone de croissance équine recombinante par LC-ESI-MSⁿ : application au contrôle de son usage illégal. XII^{èmes} Rencontres du Club Jeunes SFSM, St Dié des Vosges, 19-23 mars 2007.

Bailly-Chouriberry L, Pinel G, Garcia P, Popot MA, Le Bizec B and Bonnaire Y. New direct and indirect methods to detect recombinant equine growth hormone administered to horses. Association of Official Racing Chemists - 60th Annual Conference, Paris, 2-6 November 2007.

POSTERS

Bailly-Chouriberry L, Pinel G, Garcia P, Popot MA, Bonnaire Y, André F and Le Bizec B. New analytical strategy for measuring recombinant equine growth hormone in biological matrices by LC-ESI-(+)-MSⁿ : application to misuse control. Congress CVP, Antwerpen, Belgium, May 16-19, 2006.

Bailly-Chouriberry L, Pinel G, Garcia P, Popot MA, Bonnaire Y, André F et Le Bizec B. Application de la LC-ESI-(+)-MSⁿ aux protéines : exemple de la détection de l'hormone de croissance équine recombinante dans le plasma. 23^{èmes} JFSM, Nantes, 11-14 septembre 2006.

Bailly-Chouriberry L, Pinel G, Garcia P, Popot MA, Bonnaire Y, André F and Le Bizec B. New analytical strategy for measuring recombinant equine growth hormone in biological matrices by LC-ESI-(+)-MSⁿ: application to misuse control. 16th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians, ICRAV, Tokyo 21-27 October 2006.

Bailly-Chouriberry L, Pinel G, Popot MA, Bonnaire Y, André F and Le Bizec B. Detection of secondary biomarkers of rGH as a strategy to screen for somatotropin misuse. Biacore Food Analysis Symposium, Amsterdam, The Netherland, 15-16 November 2007.

MODES OPÉRATOIRES

Création du protocole de dosage des anticorps anti-reGH par méthode ELISA appliqué en routine au Laboratoire des Courses Hippiques (N° R 08 / 10) et au LABERCA.

Création du protocole de détection de l'eGH, reGH et rbGH dans le plasma et le sérum de cheval par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

ENCADREMENT

Le Borgne G. Stage Master 1. Développement d'une méthode analytique basée sur la chromatographie d'immuno-affinité en vue de la mesure de l'hormone de croissance équine recombinante dans le plasma. 2006.

CHAPITRE - I

TRAVAUX ANTÉRIEURS

PARTIE - 1 HORMONE DE CROISSANCE

1. DÉFINITION D'UNE HORMONE

Une hormone est une substance synthétisée et sécrétée par des glandes spécialisées bien individualisées dites glandes endocrines, transportée dans le sang et capable de réguler et de coordonner l'activité de différents tissus et organes (Beaulieu et Kelly, 1990). L'appareil endocrinien est composé de l'hypothalamus, l'hypophyse, la thyroïde, les parathyroïdes, les îlots pancréatiques, les surrénales, les testicules et les ovaires pour le système endocrinien des mammifères. La sécrétion a pour but la communication entre les différents tissus de l'organisme ; cette action doit être différenciée de l'excrétion qui correspond au rejet de constituants inutiles ou nuisibles au milieu intérieur. L'action des hormones se traduit par des modifications de la physiologie de la cellule réceptrice, et résulte de la liaison du messenger hormonal avec des récepteurs spécifiques membranaires ou intracellulaires de la cellule cible (Idelman et Verdeti, 2000).

Les hormones remplissent trois fonctions fondamentales :

- Elles permettent et favorisent le développement physique, sexuel et mental ;
- Elles permettent et favorisent l'ajustement du niveau de performance ; ainsi en l'absence de certaines hormones, les organes et les systèmes organiques deviennent incapables de modifier leur niveau d'activité pour répondre aux besoins de l'organisme ;
- Elles sont nécessaires au maintien de certains paramètres physiologiques tels que la pression osmotique et le taux de glucose sanguin.

2. DÉFINITION D'UNE PROTÉINE

Le terme de « protéine » dont l'étymologie du mot vient du grec protos qui signifie premier a pour la première fois été utilisé par Berzélius en 1838 pour montrer la première importance accordée à ce groupe de substances dont les fonctions biologiques sont remarquables. En effet, les fonctions des protéines sont nombreuses et complexes : enzymes servant de catalyseur pour les réactions chimiques se produisant chez les êtres vivants, transporteurs (hémoglobine), protéines contractiles comme les protéines musculaires mais également messagers chimiques (hormones), de défense (anticorps)...

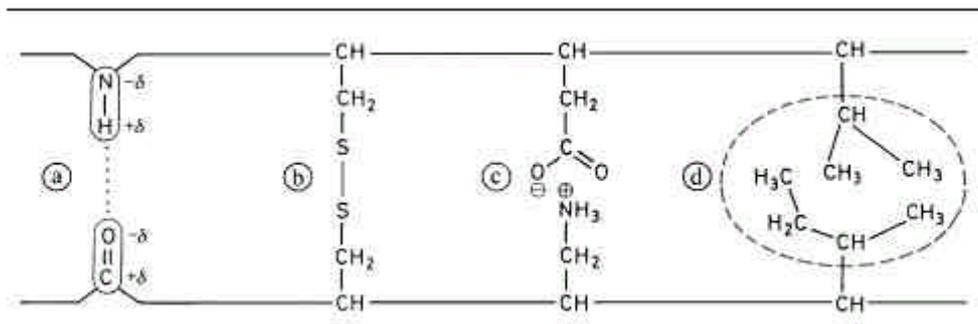


Figure I-1 : principales liaisons et interactions entre biomolécules

a : dipôle - dipôle

b : liaison covalente de type « pont disulfure »

c : interaction ionique

d : interactions hydrophobes

Les protéines sont constituées d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques (liaisons amides) et sont pourvues d'une structure tridimensionnelle complexe. La structure des protéines est répartie en plusieurs degrés d'organisation structurale, chacun dépendant du précédent (Branden et Tooze, 1996) :

➤ **La structure primaire** correspond à l'ordre d'enchaînement des acides aminés ; on parle de séquence.

➤ **La structure secondaire** décrit le premier degré de repliement de la chaîne polypeptidique en ne considérant que la disposition dans l'espace prise par la série d'acides aminés ; la disposition des chaînes latérales des résidus n'est pas considérée. Cette structure dépend des angles de torsion existant entre les acides aminés et distingue, l'hélice α , le feuillet plissé β et le coude β .

➤ **La structure tertiaire** décrit le second degré de repliement de la chaîne polypeptidique. Elle confère à la protéine un repliement dans l'espace particulier et une surface extérieure caractéristique (domaine). Elle dépend à la fois de la structure secondaire et de la nature des chaînes latérales des résidus d'acides aminés. Selon la forme adoptée par la protéine dans sa structure tertiaire, on distingue les protéines globulaires, dont les 3 dimensions dans l'espace sont du même ordre de grandeur (globe) et les protéines fibrillaires dont l'un des axes est plus long d'un ordre de grandeur que les deux autres.

➤ **La structure quaternaire** décrit l'association de plusieurs sous-unités protéiques par des liaisons non covalentes pour former le cas échéant la protéine définitive. Chaque sous-unité peut être appelée monomère ou protomère. Lorsqu'il y a peu ($n < 5$) de sous-unités, on parlera d'une protéine oligomère et dans le cas où il y a un nombre plus conséquent ($n > 5$) de sous-unités, on parlera d'une protéine polymère ou multimère. En général, les protéines oligomériques sont globulaires et les polymériques souvent fibrillaires.

Il existe 4 types de liaisons majeures (Figure I-1) entre les protéines parmi lesquelles, la liaison hydrogène (a), le pont disulfure (b) qui est une liaison covalente, la liaison ionique représentée en (c) entre un ion carboxylate et une amine, et l'interaction hydrophobe (d).

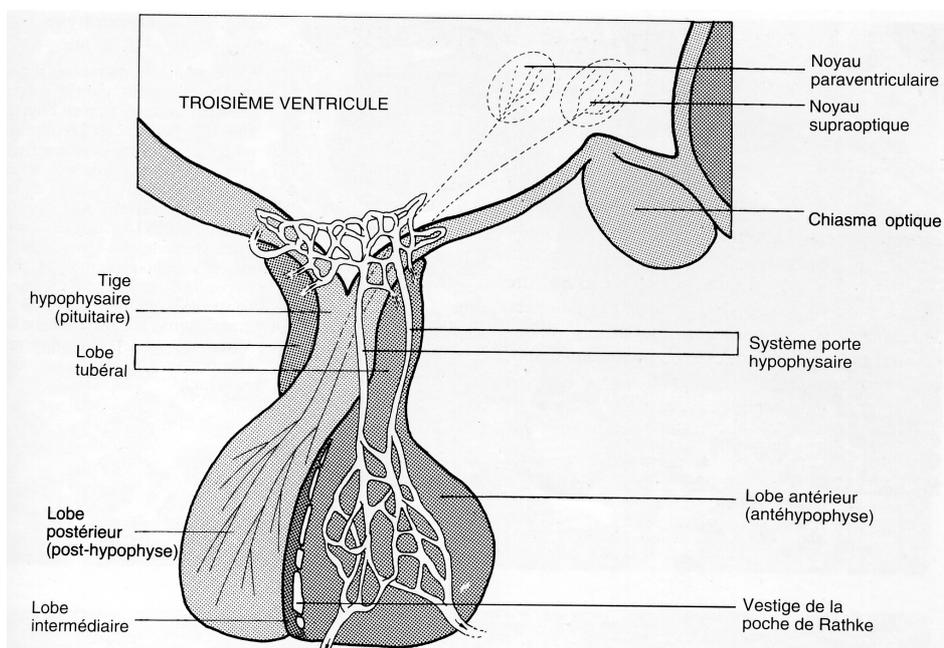


Figure I-2 : représentation schématique de l'hypophyse

3. L'HORMONE DE CROISSANCE

3.1. Production par l'hypophyse

Chez les animaux, l'hormone de croissance est produite par la *glande pituitaire* ou *hypophyse* (Friesen *et al.*, 1970 ; Rahmanian *et al.*, 1997). C'est un appendice spécialisé du cerveau qui sécrète un certain nombre d'hormones. Celles-ci sont les médiateurs de mécanismes non nerveux permettant au système nerveux central d'intégrer et de coordonner de nombreuses fonctions du corps. Les hormones hypophysaires se divisent en deux groupes fonctionnels (Idelman et Verdeti, 2000) :

↳ les hormones qui agissent directement sur des tissus non endocriniens : l'hormone de croissance (GH), la prolactine (PRL), l'hormone antidiurétique (ADH), l'ocytocine et l'hormone mélanotrope (MSH).

↳ les hormones qui modulent l'activité sécrétoire d'autres glandes endocrines (stimulines) : la thyroïdostimuline (TSH), la corticotrophine (ACTH) et les hormones gonadotropes, l'hormone folliculostimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH). Ainsi, la thyroïde, les surrénales et les gonades peuvent être décrites comme des *glandes endocrines hypophysodépendantes*.

La sécrétion de toutes les hormones hypophysaires est directement contrôlée par l'hypothalamus, qui subit l'influence de stimuli nerveux provenant des centres supérieurs du système nerveux central. Elle est aussi sous l'influence d'un rétrocontrôle basé sur les taux d'hormones circulantes produites par les glandes hypophysodépendantes. C'est pour ces raisons que la sécrétion de l'hormone de croissance est pulsatile.

D'un point de vue structural, chez les mammifères, l'hypophyse est un organe allongé (environ 1 cm de diamètre chez l'homme), situé immédiatement sous le troisième ventricule dans une cavité osseuse de la base du crâne : la selle turcique (os sphénoïde). La glande est divisée en deux parties, antérieure et postérieure, qui ont une origine embryologique, des fonctions et des mécanismes de contrôle tout à fait différents (Figure I-2). Dans le cadre de l'étude de l'hormone de croissance, l'antéhypophyse, sécrétrice de ce messenger chimique par les cellules α qui la composent, sera plus largement détaillée par la suite.

L'antéhypophyse naît sous la forme d'une expansion développée à partir du toit de la cavité buccale primitive, appelée *poche de Rathke*. Cet épithélium glandulaire spécialisé s'enroule autour de la partie antérieure de la post-hypophyse et est souvent appelé *adénohypophyse*. Celle-ci peut comporter une fente ou un groupe d'espaces kystiques, vestiges de la lumière de la poche de Rathke. Cette fente vestigiale sépare la plus grande partie de l'antéhypophyse d'une fine zone de tissu située contre le lobe postérieur ; cette fine zone est appelée *lobe intermédiaire*. Le *lobe tubéral* est une extension de l'adénohypophyse qui entoure la tige pituitaire.

3.2. Production par l'hippocampe

En 2006, une équipe américaine (Donahue *et al.*, 2006) a montré qu'il y avait production endogène d'hormone de croissance chez l'homme dans l'hippocampe, une structure du cerveau associée à l'apprentissage et aux aspects émotionnels de la vie des individus.

3.3. Gènes, polymorphisme allélique

Chez l'homme, l'hormone de croissance (GH) est une protéine hétérogène possédant de nombreuses formes moléculaires appelées isoformes. Elle est codée par deux gènes distincts situés sur le chromosome 17 : hGH-N (GH-1, normal) présente sous deux formes très proches et hGH-V (GH-2, variant) (Strobl et Thomas, 1994). La comparaison des structures primaires de hGH-N et hGH-V montre une différence sur 13 résidus. GH-N est sécrétée de façon pulsatile par les cellules de la partie antérieure de l'antéhypophyse sous le contrôle de l'hypothalamus.

A noter qu'une petite quantité de GH-N est produite par les lymphocytes B du système immunitaire (Popii et Baumann, 2004). GH-V est produite exclusivement par le placenta mais la majorité de l'hormone de croissance circulante provient de l'antéhypophyse. Il n'y a pas de preuve que l'hormone de croissance issue des lymphocytes contribue de façon significative aux quantités présentes dans le plasma. Chez tous les mammifères non primates (bovins, équins, porcins...), l'hormone de croissance semble être exprimée uniquement par les cellules somatotropes de l'antéhypophyse (Secchi et Borromeo, 1997). Le gène unique de la somatotropine bovine (bGH) et porcine (pGH) est composé de 4 introns (A-D) et de 5 exons (1 à 5) localisés sur le chromosome 19 (Vize et Wells, 1987).

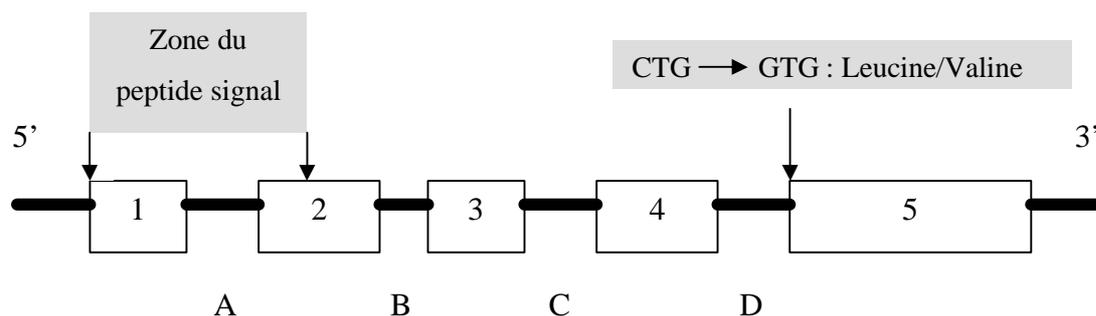


Figure I-3 : représentation du gène codant pour l'hormone de croissance bovine et le polymorphisme L/V en 127

Tableau I-1 : les quatres isoformes de la bGH (AA : acides aminés)

Deux formes majoritaires (2/3)	Séquence N-terminale
191 AA	NH ₂ -Ala-PheLeu ₁₂₇
190 AA	NH ₂ -Phe.....Leu ₁₂₆ ...
Deux formes minoritaires (1/3)	Séquence N-terminale
191 AA	NH ₂ -Ala-Phe.....Val ₁₂₇
190 AA	NH ₂ -Phe.....Val ₁₂₆ ...

Tableau I-2 : homologie de séquence entre bGH et GHs d'autres espèces, en ne tenant compte que de l'isoforme majoritaire pour chacune des espèces.

Espèces	Nombre d'acides aminés	Nombre d'acides aminés identiques à bGH	Pourcentage d'homologie (%)	Masse molaire moyenne calculée (Da)	Point isoélectrique théorique
Humaine : <i>Homo sapiens</i>	191	127	66,5	22228	5,45
Equine : <i>Equus caballus</i>	190	170	89,5	21757	7,01
Porcine : <i>Sus scrofa</i>	190	172	90,6	21731	7,01
Bovine : <i>Bos taurus</i>	191	191	100	21791	7,86

Les 25 premiers acides aminés codés par l'exon 1 et une partie de l'exon 2 dirigent la synthèse du peptide signal. L'hormone mature circulante associée à son peptide signal forme la prohormone. La variation survenant en position N-terminale lors du clivage du peptide signal (alanine ou phénylalanine) apparaît sans qu'il y ait d'élément génétique connu responsable de cette variabilité. En revanche, la variabilité en position 126/127 s'explique par la présence de codons différents sur le gène codant pour l'hormone de croissance bovine (Figure I-3). Par conséquent, dans le cas de la bGH, il existe quatre isoformes (Tableau I-1) qui diffèrent par la position de l'acide aminé N-terminal ainsi que l'acide aminé situé en position 127 de la séquence.

3.4. Structure de l'hormone de croissance

3.4.1. Structure primaire et secondaire de l'hormone de croissance

L'hormone, de nature protéique, est classée parmi les hormones (dites) hydrophiles par opposition aux hormones stéroïdes (dites) hydrophobes. D'une masse moléculaire de 22 kDa, elle est constituée d'une seule chaîne d'acides aminés. La composition en acides aminés des somatotropines est connue pour de nombreuses espèces ce qui a permis de réaliser des alignements de séquences pour déterminer leur pourcentage d'homologie par rapport à l'hormone bovine, bGH (Secchi et Borromeo, 1997). La comparaison des séquences protéiques entre espèces permet de mettre en évidence les bases de l'évolution moléculaire et fournit dans le même temps, des critères de repérage des portions de séquences ou de sites précis jouant un rôle essentiel dans l'activité biologique de l'hormone de croissance (Tableau I-2). Cela permet d'obtenir des prédictions très intéressantes quant au mode d'action de la molécule.

Le Tableau I-3 présente la séquence primaire de 10 hormones de croissance correspondant à 8 espèces animales classées par ordre décroissant du pourcentage d'identité obtenu par alignement de séquence (BLAST) contre l'hormone équine endogène. Dans le cadre de la lutte antidopage chez les chevaux de courses, ce tableau permet de visualiser les molécules les plus proches en acides aminés potentiellement utilisables en pratique frauduleuse. Il faut par conséquent considérer que les hormones de croissance de porc (pGH), chien et chat présentant 97-98 % d'identité de séquence pourraient être administrées à un cheval. A l'heure actuelle, seule la pGH est disponible dans le commerce. De plus, la bGH avec 89 % d'identité pourra faire l'objet d'études car elle est disponible auprès de différents fournisseurs.

Tableau I-3 : structure primaire de l'hormone de croissance pour 8 espèces animales avec leur pourcentage d'identité par rapport à l'hormone équine endogène

Numéro d'accès Swissprot	Animaux	Ordre par identité (%)	Séquences des peptides signaux			Séquences des hormones de croissance matures		
			1	11	21	1	11	21
P01245	Cheval	1- 100	MAAGPRTSVL	LAFGLLCLPW	PQDVGA	FPAMPLSSSLF	ANAVLRAQHL	HQLAADTYKE
P01248	Porc	2- 98	MAAGPRTSAL	LAFALLCLPW	TREVGA	FPAMPLSSSLF	ANAVLRAQHL	HQLAADTYKE
P33711	Chien	3- 98	MAASPRNSVL	LAFALLCLPW	PQEVGA	FPAMPLSSSLF	ANAVLRAQHL	HQLAADTYKE
P46404	Chat	4- 97	MAAGPRNSVL	LAFALLCLPW	PQEVGT	FPAMPLSSSLF	ANAVLRAQHL	HQLAADTYKE
P06880	Souris	5- 94	MATDSRTSWL	LTVSLLCLLW	PQEASA	FPAMPLSSSLF	ANAVLRAQHL	HQLAADTYKE
P01244	Rat	6- 94	MAADSQTPWL	LTFSLLCLLW	PQEAGA	FPAMPLSSSLF	ANAVLRAQHL	HQLAADTYKE
P01246	Vache	7- 89	MMAAGPRTSL	LLAFALLCLP	WTQVVG	FPAMSLSGLF	ANAVLRAQHL	HQLAADTFKE
Q6IYF0	Homme GH1-1	8- 67	MATGSRTSLL	LAFGLLCLPW	LQEGSA	FPPTPLSRLF	DNAMLRAHRL	HQLAFDTYQE
Q6IYF1	Homme GH1-2	9- 66	MATGSRTSLL	LAFGLLCLPW	LQEGSA	FPPTPLSRLF	DNVMLRAHRL	HQLAFDTYQE
P01242	Homme GH2-V	10- 64	MAAGSRTSLL	LAFGLLCLSW	LQEGSA	FPPTPLSRLF	DNAMLRARRL	YQLAADTYQE

Ordre	Séquences des hormones de croissance matures									
	31	41	51	61	71	81	91	101		
1-----	FERAYIPEGQ	RYSI-QNAQAA	FCFSETIPAP	TGKDEAQQRS	DMELLRFSL	LIQSWLGPVQ	LLSR-VFTNSL	VFGTSDR-VYE		
2-----	FERAYIPEGQ	RYSI-QNAQAA	FCFSETIPAP	TGKDEAQQRS	DVELLRFSLL	LIQSWLGPVQ	FLSR-VFTNSL	VFGTSDR-VYE		
3-----	FERAYIPEGQ	RYSI-QNAQAA	FCFSETIPAP	TGKDEAQQRS	DVELLRFSLL	LIQSWLGPVQ	FLSR-VFTNSL	VFGTSDR-VYE		
4-----	FERAYIPEGQ	RYSI-QNAQAA	FCFSETIPAP	TGKDEAQQRS	DVELLRFSLL	LIQSWLGPVQ	FLSR-VFTNSL	VFGTSDR-VYE		
5-----	FERAYIPEGQ	RYSI-QNAQAA	FCFSETIPAP	TGKEEAQQRT	DMELLRFSL	LIQSWLGPVQ	FLSR-VFTNSL	MFGTSDR-VYE		
6-----	FERAYIPEGQ	RYSI-QNAQAA	FCFSETIPAP	TGKEEAQQRT	DMELLRFSL	LIQSWLGPVQ	FLSR-VFTNSL	MFGTSDR-VYE		
7-----	FERTYIPEGQ	RYSI-QNTQVA	FCFSETIPAP	TGKNEAQQKS	DLELLRISLL	LIQSWLGPVQ	FLSR-VFTNSL	VFGTSDR-VYE		
8-----	FEEAYIPKEQ	KYSFLQNPQTS	LCFSESIPTP	SNREETQQKS	NLELLRISLL	LIQSWLEPVQ	FL-RSVFANSL	VYGASDSNVYD		
9-----	FEEAYIPKEQ	KYSFLQNPQTS	LCFSESIPTP	SNREETQQKS	NLELLRISLL	LIQSWLEPVQ	FL-RSVFANSL	VYGASDSNVYD		
10-----	FEEAYILKEQ	KYSFLQNPQTS	LCFSESIPTP	SNRVKTQQKS	NLELLRISLL	LIQSWLEPVQ	LL-RSVFANSL	VYGASDSNVYR		

Ordre	Séquences des hormones de croissance matures							
	111	121	131	141	151	161	171	181
1-----	KLRDLEEGIQ	ALMRELEDGS	PRAGQILKQT	YDKFDTNLS	DDALLKNYGL	LSCFKKDLHK	AETYLVMKC	RRFVSSCAF
2-----	KLKDLEEGIQ	ALMRELEDGS	PRAGQILKQT	YDKFDTNLS	DDALLKNYGL	LSCFKKDLHK	AETYLVMKC	RRFVSSCAF
3-----	KLKDLEEGIQ	ALMRELEDGS	PRAGQILKQT	YDKFDTNLS	DDALLKNYGL	LSCFKKDLHK	AETYLVMKC	RRFVSSCAF
4-----	KLKDLEEGIQ	ALMRELEDGS	PRGGQILKQT	YDKFDTNLS	DDALLKNYGL	LSCFKKDLHK	AETYLVMKC	RRFVSSCAF
5-----	KLKDLEEGIQ	ALMQELEDGS	PRVGGQILKQT	YDKFDANMRS	DDALLKNYGL	LSCFKKDLHK	AETYLVMKC	RRFVSSCAF
6-----	KLKDLEEGIQ	ALMQELEDGS	PRIGQILKQT	YDKFDANMRS	DDALLKNYGL	LSCFKKDLHK	AETYLVMKC	RRFAESSCAF
7-----	KLKDLEEGIL	ALMRELEDGT	PRAGQILKQT	YDKFDTNMRS	DDALLKNYGL	LSCFRKDLHK	TETYLVMKC	RRFGEASCAF
8-----	LLKDLEEGIQ	TLMRRLEDGS	PRTGQIFKQT	YSKFDTNSHN	DDALLKNYGL	LYCFRKDMDK	VETFLRIVQC	RS-VEGSCGF (191)
9-----	LLKDLEEGIQ	TLMGRLEDGS	PRTGQIFKQT	YSKFDTNSHN	DDALLKNYGL	LYCFRKDMDK	VETFLRIVQC	RS-VEGSCGF (191)
10-----	HLKDLEEGIQ	TLMWRLEDGS	PRTGQIFNQS	YSKFDTKSHN	DDALLKNYGL	LYCFRKDMDK	VETFLRIVQC	RS-VEGSCGF (191)

■ : peptide N-terminal par digestion trypsique; ■ : acide aminé différent dans le peptide N-terminal ; ■ : acide aminé différent dans la séquence; ■ : nouvel emplacement d'un acide aminé; ■ : position des cystéines pour la formation des ponts disulfures



Figure I-4 : structure secondaire en diagramme topographique de l'hormone de croissance

L'hormone humaine avec seulement 66 % d'identité de séquence semble moins intéressante mais peut être utilisée en théorie en dopage équin car elle est commercialisée à grande échelle et est utilisée comme traitement thérapeutique.

Comme présenté dans le Tableau I-3 d'alignement de séquence, les molécules d'hormone de croissance ne possèdent chacune que quatre cystéines. Ces cystéines, éléments de formation des ponts disulfures sont remarquablement situées à la même position. Pour le cheval, le porc, le chien, le chat, la souris et le rat aux résidus 52, 163, 180 et 188. Pour la vache, de part la présence de l'alanine supplémentaire en position N-terminale, les cystéines sont situées en positions 53, 164, 181 et 189 et pour l'homme, aux positions 53, 165, 182 et 189. Les ponts disulfures initiateurs de la structure tertiaire se font ainsi entre les acides aminés 52-163 et 180-188. Ils ont ainsi été décrits chez le cheval (Olivier et Stockell Hartree, 1968 ; Zakin *et al.*, 1976) et de manière identique pour les autres espèces (Becker et Hsiung, 1986 ; Secchi et Borromeo, 1997 ; Kopchick et Andry, 2000).

La structure secondaire, « tout alpha » est constituée de 4 hélices α antiparallèles arrangées en paquet d'hélices. Les deux premières hélices sont parallèles et de direction « up-up » et les deux autres « down-down » (Figure I-4) (Branden et Tooze, 1996). Cette structure particulière est similaire à de nombreuses hormones de croissance et semble être une caractéristique biologique très conservée parmi les membres de la super famille hématopoïétique (Secchi et Borromeo, 1997).

3.4.1.1. Modifications post-traductionnelles et isoformes

Les modifications post-traductionnelles sont des modifications chimiques de certaines fonctions chimiques des chaînes latérales des aminoacides qui ont lieu généralement lors de la maturation de la protéine. De nombreuses modifications post-traductionnelles de l'hormone de croissance ont ainsi été rapportées. En effet, il a été montré chez le bovin, une désamidation localisée des résidus asparagine (N) et glutamine (Q) respectivement en acide aspartique (D) et glutamique (E) sur les positions 13, 140 et 148 (Secchi et Borromeo, 1997). Des molécules de GH phosphorylées (P-GH) ont été mises en évidence chez l'homme (Giorgianni *et al.*, 2004), chez le mouton où la GH possède 98% d'homologie avec la bGH, ainsi que chez le rat et le poulet mais jamais chez le bovin. A noter que pour l'espèce bovine, une hormone très proche de l'hormone de croissance, la prolactine, a été trouvée phosphorylée (Kim et Brooks, 1993). Les auteurs de cette découverte indiquent aussi, après modélisation et alignement de séquences, qu'il n'est pas exclu que les hormones de croissance bovines, porcines et équines soient phosphorylées sur la sérine en position 84 (Tableau I-3).

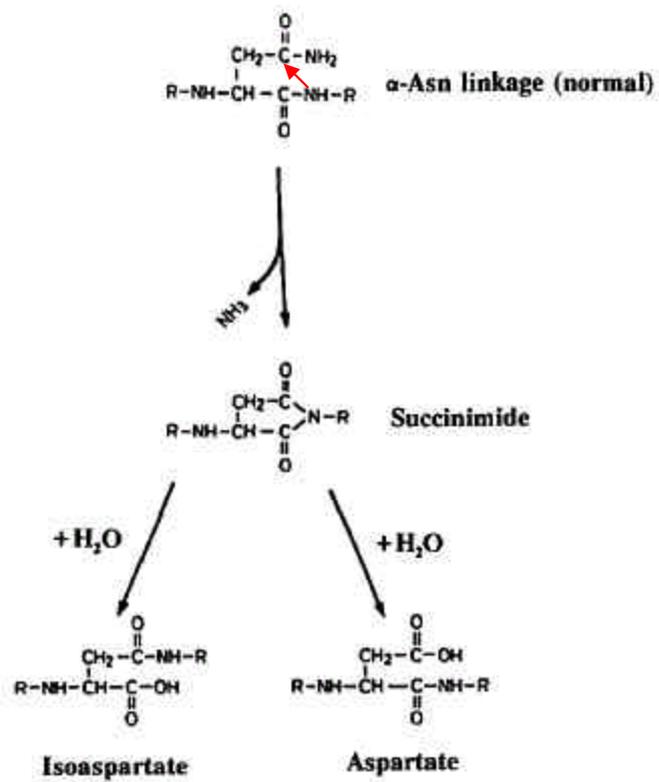


Figure I-5 : mécanisme de formation des acides isoaspartique et aspartique à partir de l'asparagine

L'autre grande classe de modification post-traductionnelle est la glycosylation. Des hormones de croissance glycosylées (G-GH) ont été mises en évidence chez l'homme (Ray *et al.*, 1989 ; Haro *et al.*, 1996), le rat et la souris (Bollengier *et al.*, 1989), le poulet (Berumen *et al.*, 2004) et le porc (Sinha *et al.*, 1990). Aucune information sur une potentielle glycosylation chez le bovin ou l'équin n'a été recensée.

Il n'existe pas à l'heure actuelle d'informations précises concernant les modifications post-traductionnelles pour la population équine bien qu'il ait été mis en évidence, à partir d'hypophyses de chevaux, une forme où la séquence 76-92 serait absente (Cascone *et al.*, 1992).

3.4.1.2. Modifications chimiques *in vitro*

De nombreuses observations de modifications chimiques de l'hormone de croissance *in vitro* ont été rapportées (Teh *et al.*, 1987 ; Johnson *et al.*, 1989 ; Teshima *et al.*, 1991 ; Karlsson *et al.*, 1999). Ces modifications chimiques sont imputées aux conditions de stockage (pH, lumière) et au vieillissement des échantillons. Ces modifications sont d'une part les désamidations des asparagines et des glutamines respectivement en acide aspartique et glutamique lorsque ces aminoacides sont très exposés au solvant (Riggin *et al.*, 1987 ; Violand *et al.*, 1992 ; Bayol *et al.*, 2004). Le mécanisme présenté Figure I-5, indique que le doublet non liant de la fonction amine du côté C-terminal va attaquer le carbonyle de l'asparagine et libérer NH₃ pour former un intermédiaire succinimide. L'hydrolyse de ce succinimide conduit à la formation des deux formes acides.

D'autre part, la modification des méthionines en méthionine-sulfoxydes a été rapportée. Chez l'homme, les 3 méthionines en position 14, 125 et 170 ne sont pas toutes sujettes à cette oxydation. Le résidu le plus susceptible d'être oxydé est le 125 suivi de la méthionine en position 14. La méthionine en position 170 est résistante à l'oxydation (Teh *et al.*, 1987). Des résultats liés à l'étude des hormones de croissance hypophysaires canine, équine et porcine indiquent la présence de méthionine sulfoxyde en position 4 (Secchi *et al.*, 2001).

3.4.1.3. Point isoélectrique des hormones de croissance

Les informations de point isoélectrique (pI) obtenues par isoélectrofocalisation ou électrophorèse bidimensionnelle ont permis d'estimer le pI de l'eGH entre 6,7 et 6,8 (Conde *et al.*, 1973), le pI de la bGH/rbGH entre 7,8 et 8 (Spitsberg, 1987 ; Pinel *et al.*, 2005), le pI de la pGH/rpGH entre 5 et 7 (Chen *et al.*, 1970 ; Secchi *et al.*, 1999 ; Ouyang *et al.*, 2003) et de l'hGH avec ses isoformes entre 5,2 (Jung *et al.*, 2005) et 5,9 (Beranova-Giorgianni et Desiderio, 2000 ; Zhan et Desiderio, 2003 ; Zhan *et al.*, 2005).



Figure I-6 : modélisation moléculaire, hGH (résolution : 2,5 Å)

(Chantalat *et al.*, 1995)

Tableau I-4 : tableau des isoformes de l'hormone de croissance humaine, 15 min après une sécrétion
(Popii et Baumann, 2004)

Formes circulantes	Composition	Pourcentage (%)
Monomériques	22-kDa	45
	20-kDa	7
	Déamido-hGH ([Asp ¹⁵²]22-kDa)	5
	Déamido-hGH ([Glu ¹³⁷]22-kDa)	
	N-acylé 22-kDa	
Formes réduites (hGH ₁₋₄₃) et (hGH ₄₄₋₁₉₁)	< 1	
Oligomériques	Homo et hétérodimères	29
	Trimères, pentamères	14

3.4.2. Structure tertiaire de l'hormone de croissance

Les premières études conformationnelles de l'hormone de croissance équine ont été réalisées par spectroscopie et dichroïsme circulaire (Bewley et Li, 1987). Des procédures de cristallisation de l'hormone de croissance bovine ont été publiées mais elles n'ont jamais permis de produire des cristaux compatibles avec une étude cristallographique (Secchi et Borromeo, 1997). Aujourd'hui, les méthodes de purification de la bGH et de l'eGH permettent de les obtenir à un haut degré de pureté, mais leur structure tridimensionnelle n'a toujours pas été décrite. Dans ces conditions, nous devons encore nous référer aux modèles d'autres espèces comme l'hormone de croissance humaine (hGH). D'après la Figure I-6, l'hormone de croissance est de type globulaire contenant 4 hélices alpha et 2 ponts disulfures.

3.4.3. Structure quaternaire de l'hormone de croissance

Chez l'homme, l'hormone de croissance existe sous forme d'oligomères (Wood, 2001 ; Popii et Baumann, 2004). Bien que ces formes étaient initialement supposées être des artéfacts de purification, ils furent plus tard confirmés comme étant des espèces natives à la fois dans l'hypophyse et dans le plasma. Il existe à la fois des formes covalentes *via* les ponts disulfures (Grigorian *et al.*, 2005) et non covalentes *via* des interactions entre des cations métalliques divalents tels que Fe^{2+} , Ca^{2+} et Mg^{2+} et les résidus d'acide aspartique glutamique exposés au solvant (Haro *et al.*, 1998). Le Tableau I-4 présente la complexité des différentes formes circulantes chez l'homme. Chez le bovin, il a été trouvé dans des lots d'hormone de croissance recombinante des formes dimères et agrégées (Chang *et al.*, 1996). Aucune information liée à une structure oligomérique de l'hormone de croissance équine n'a été rapportée.

3.5. Récepteurs et signalisation intracellulaire de l'hormone de croissance

3.5.1. Le récepteur extracellulaire (GH-R)

Le récepteur de l'hormone de croissance (GH-R) est une glycoprotéine transmembranaire dont la forme glycosylée peut atteindre 100 kDa (Laursen, 2004). Le récepteur de l'hormone de croissance humaine possède un degré élevé d'homologie de séquence (>70 %) avec les GH-R des espèces bovine et porcine (Strobl et Thomas, 1994). Ce récepteur fait partie de la superfamille des récepteurs hématopoïétiques qui comprend le récepteur à la prolactine (PRL), à l'érythropoïétine (EPO) et à certaines interleukines (ILs) (Carter-Su *et al.*, 1996).

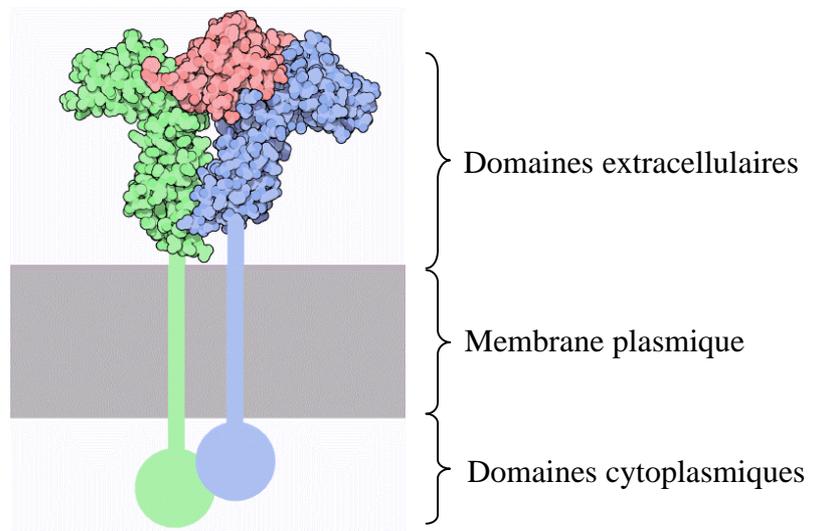


Figure I-7 : hormone de croissance (rouge), liée à son récepteur (dimère vert et bleu).

http://www.rcsb.org/pdb/molécules/pdb52_2.html

Ces récepteurs possèdent un domaine cytoplasmique variable, un domaine extracellulaire plus conservé et un seul domaine transmembranaire hydrophobe (Figure I-7). Ce récepteur a été trouvé dans de nombreux tissus et cellules à l'exception de certains organes comme le thymus, les testicules et le cerveau où son ARNm est indétectable (Kelly *et al.*, 1991 ; Strobl et Thomas, 1994). Les hépatocytes et les adipocytes sont les cellules dans lesquelles le niveau d'expression est le plus élevé.

Le récepteur de l'hormone de croissance est en réalité une protéine dimérique liant une molécule de GH dans deux régions distinctes : les deux sites de l'hormone sont nommés sites I et II. Le site I implique les résidus de la partie C-terminale : l'hélice 4 (résidus 164-191), quelques résidus de l'hélice 1 et la boucle entre l'hélice 1 et l'hélice 2. Le site II implique les résidus de la partie N-terminale : une partie de l'hélice 1 (résidus 3-19) et quelques résidus de l'hélice 3 (Figure I-7). Lorsque la GH se lie à la première molécule du récepteur, il y a formation d'un complexe inactif. Lors du recrutement de la deuxième molécule de récepteur au niveau du second site de liaison de l'autre côté de l'hormone, l'ensemble du complexe protéique devient fonctionnel et physiologiquement actif (Figure I-7).

3.5.2. *Les protéines de transport de l'hormone de croissance (GH-BP)*

Chez l'homme, le sang contient deux types de GH-BP, l'une de forte affinité pour la GH (GHBP-1) et l'autre de faible affinité (GHBP-2) (Baumann, 2001). La protéine de liaison de forte affinité correspond au domaine extracellulaire du récepteur de la GH. Chez l'homme, la libération de ce domaine est effectuée par coupure protéolytique du récepteur de la GH par une métalloprotéase à zinc appelée TACE (Tumor necrosis factor α -Converting Enzyme) (Baumann et Franck, 2002). En moyenne, il est estimé que 45-50 % de la GH circulante (forme 22 kDa) est complexée à la GHBP-1 (Baumann *et al.*, 1988 ; Fuh *et al.*, 1990). Dans le sérum, la GHBP-2 lie la GH avec une faible affinité. Cette molécule est une α_2 -macroglobuline modifiée et lie 5 à 8 % de la GH (Baumann *et al.*, 1989).

Il a été montré que ces protéines de transport permettent de protéger la GH de la dégradation pour en prolonger le temps de demi-vie (Baumann *et al.*, 1987). A titre d'exemple, le temps de demi-vie de la GH libre est de 7 min contre 27 min lorsque la GH est liée (Baumann, 1993). Il semble que ces GH-BP aient un rôle de régulation (« tampon ») entre les pics de sécrétion de GH et les phases creuses.

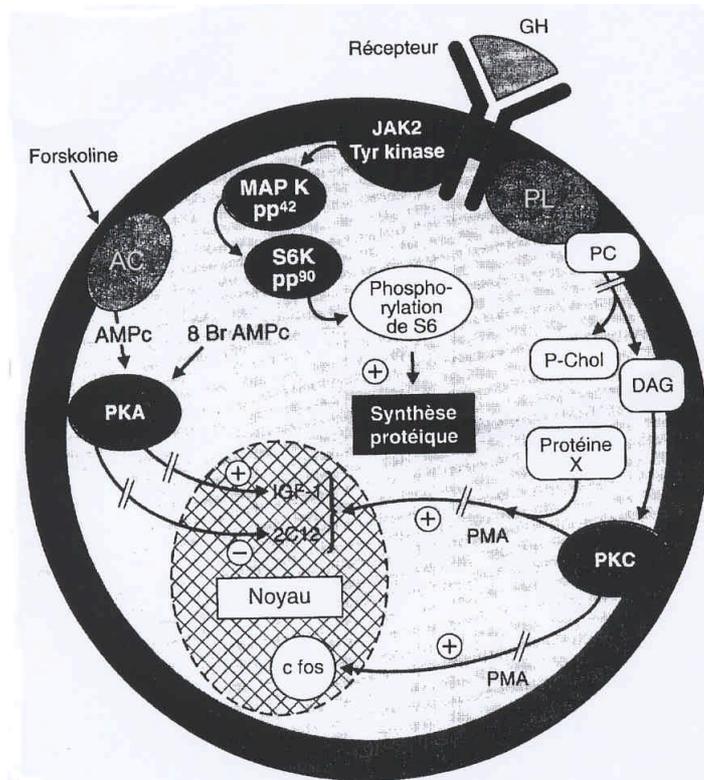


Figure I-8 : diagramme schématisant les voies de signalisation de l'hormone de croissance dans les cellules cibles (Le Cam et Legraverend, 1993). PL : phospholipases, PC : phosphatidylcholine, P-chol : phosphocholine, DAG : diacylglycérol, AC : adénylate cyclase.

En effet, la fraction de GH liée à la GH-BP augmente entre les pulses de GH ce qui prolonge la libération de l'hormone de croissance lorsque celle-ci n'est pas sécrétée (libération retardée), alors que la concentration de GH libre augmente pendant les pics de sécrétion de GH, permettant ainsi d'augmenter la clairance de la GH (Veldhuis *et al.*, 1993). Quand la concentration de GH est supérieure à $20 \mu\text{g.L}^{-1}$, une fraction réduite de la GH circulante est liée à sa protéine de transport (Baumann *et al.*, 1988). Ainsi, les GH-BP semblent réguler les variations de concentration de la GH et en outre permettre de maintenir des taux de GH très bas avant d'atteindre une concentration nulle en GH (Laursen, 2004).

3.5.3. *Le mécanisme intracellulaire*

L'action de l'hormone de croissance au niveau de son récepteur passe par 3 étapes (Le Cam et Legraverend, 1993), (Figure I-8) :

a-) la liaison de l'hormone à son récepteur où une molécule d'hormone se lie à deux molécules de récepteur (GH-R).

b-) la transmission du message (transduction) passe par au moins 2 voies :

- celle initiée par la phosphorylation de la protéine JAK-2 (Janus kinase 2) qui possède une fonction tyrosine kinase. Elle conduit à la phosphorylation de la protéine ribosomale S6, ce qui induit une augmentation de la synthèse protéique.
- celle des médiateurs dérivés de la dégradation des lipides membranaires.

c-) l'activation de phospholipases (PL) permet l'hydrolyse des phospholipides dont la phosphatidylcholine (PC) et libère ainsi des médiateurs intracellulaires tels que la phosphocholine (P-chol) et le diacylglycérol (DAG). Cet effet est suivi de l'activation des protéines kinases C (PKC) qui, dans l'hépatocyte, stimule l'activation de différents gènes, en particulier ceux codant pour l'IGF-1, c-FOS (protooncogène) et le cytochrome P450 2C12. Cette action de la PKC, qui nécessite la présence d'une protéine non encore caractérisée (X), est modulée par la protéine kinase A.

3.5.4. *Internalisation des complexes récepteurs-hormones*

De façon générale, les hormones polypeptidiques telles que l'hormone de croissance, l'insuline, la prolactine subissent après avoir formé un complexe avec leur récepteur membranaire, un processus rapide d'internalisation par endocytose (Roupaes et Herington, 1988).

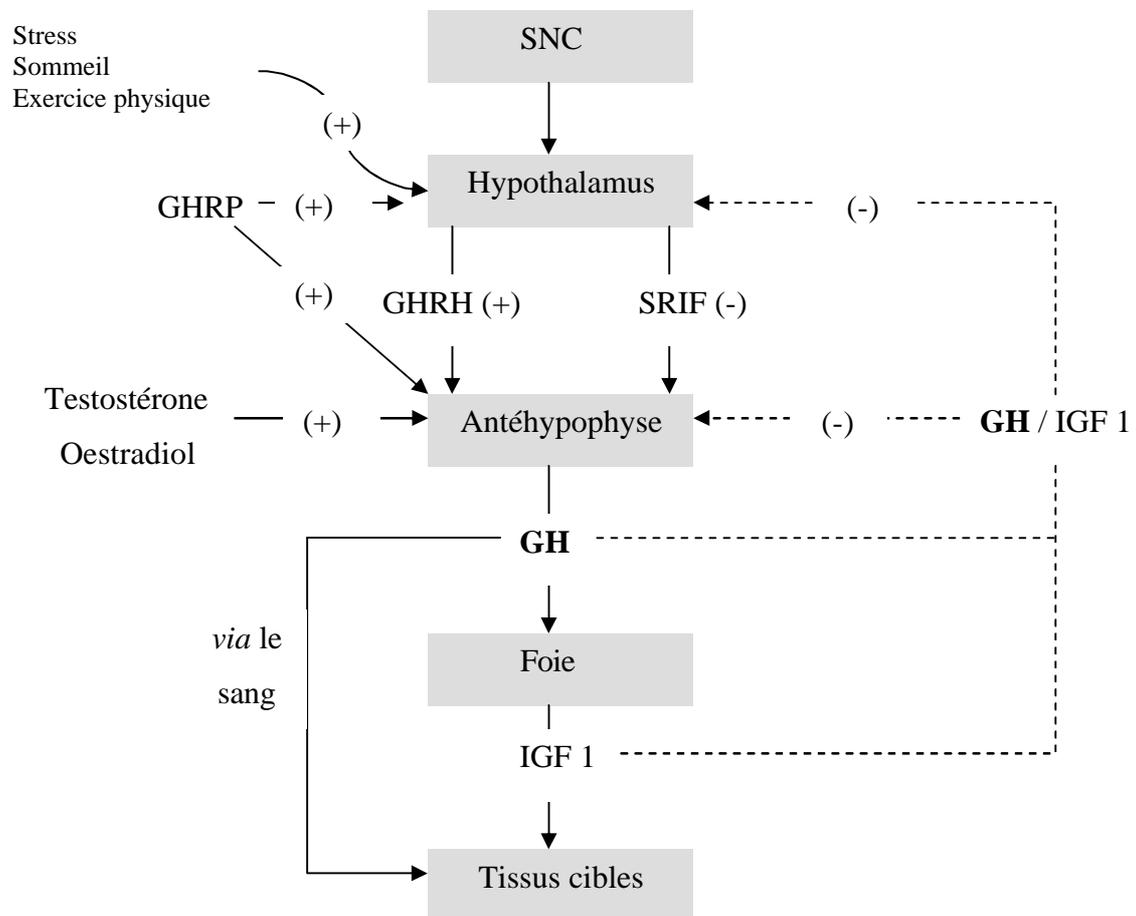


Figure I-9 : représentation schématique de l'axe somatotrope

- GHRH, GRH ou SRF : somatocrinine ou somatolibérine, activateur.
- SRIF : somatostatine, inhibiteur.
- GHRP : Growth hormone releasing peptide ou sécrétagogue, activateur.

Le mécanisme d'internalisation du complexe [GHR-GH] dépend de l'ubiquitination du récepteur (Govers *et al.*, 1997 ; kerkhof *et al.*, 2000) et d'un mécanisme assez complexe de recrutement de protéines cytosoliques faisant intervenir des filaments de clathrine (Lesniak et Roth, 1976). Après avoir fusionné avec une vésicule de l'appareil de Golgi, le récepteur et l'hormone se dissocient. L'hormone est ensuite transférée dans un lysosome où elle est dégradée (Murphy et Lazarus, 1984). Pendant ce temps, les molécules de récepteurs peuvent être dégradées *via* le protéasome ou être recyclées en reprenant leur place au niveau de la membrane plasmique. Le recyclage n'exclut pas une néoformation de récepteurs par synthèse protéique. Ce processus d'internalisation du récepteur explique pour partie le phénomène de « down-regulation », c'est à dire la diminution du nombre de sites récepteurs lorsque le nombre de molécules apportées par la circulation augmente (Roupas et Herington, 1988).

3.6. Contrôle de la sécrétion de l'hormone de croissance

3.6.1. Contrôle par les hormones hypothalamiques hypophysiotropes

L'hypothalamus exerce une influence régulatrice sur l'antéhypophyse (Green et Harris, 1947). Les produits de sécrétion des neurones hypothalamiques sont transportés vers l'adénohypophyse par le système porte hypophysaire (Figure I-9).

Cette neurosécrétion qui atteint les différentes cellules cibles de l'hypophyse constitue pour chacune des catégories cellulaires un facteur provoquant leur excrétion dans la circulation sanguine, d'où le nom de « releasing factor » (RF) ou « releasing hormone » (RH), ou encore libérine. Dans quelques cas, ce facteur sera un inhibiteur, « inhibiting factor » (IF) ou « inhibiting hormone » (IH) (Idelman et Verdeti, 2000). Les produits de sécrétion de l'hypothalamus contrôlent donc toutes les sécrétions hormonales adénohypophysaires. Tous les RF ou IF sont des polypeptides. Lorsque la structure chimique du facteur est identifiée, on peut parler d'hormone : RF→RH et IF→IH. Ces facteurs peuvent être considérés comme des messagers chimiques neuro-endocriniens ayant comme cellules cibles les cellules somatotropes de l'hypophyse.

3.6.2. Contrôle par les sécrétagogues (GHRP)

Après une administration intraveineuse, sous-cutanée, intranasale ou même orale, les GHRP, Growth Hormone Releasing Peptide ou sécrétagogues (Bercu et Walker, 1996 ; Ankersen *et al.*, 1999) sont capables d'induire la libération de GH chez l'homme ou l'animal.

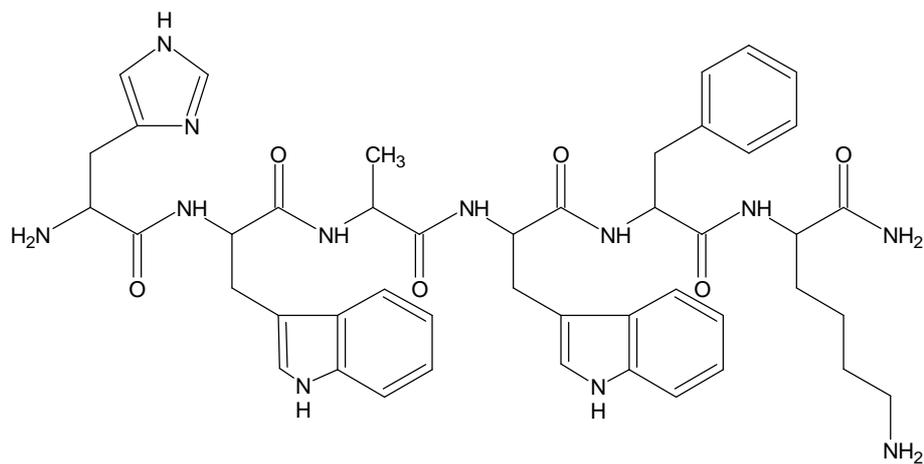


Figure I-10 : structure de GHRP-6



Figure I-11 : structure primaire de la Ghrelin humaine.

Les sécrétagogues présentent des actions centrales et agissent tant au niveau de l'hypothalamus que de l'hypophyse.

Le mode d'action des GHRP est différent de celui des GHRH sur les cellules somatotropes de l'hypophyse. Les GHRH augmentent la concentration intracellulaire en AMPc alors que les GHRP vont activer le calcium intracellulaire, dépolariser la membrane et ainsi se comporter comme antagonistes fonctionnels de la somatostatine (Ankersen *et al.*, 1999 ; Kojima *et al.*, 2001). De plus, il est rapporté que la combinaison de l'augmentation des taux d'AMPc avec l'activation du calcium dans la cellule a une action synergique sur la libération de GH.

Les sécrétagogues sont d'une part des oligopeptides contenant quelques résidus d'acides aminés : GHRP-6 (Figure I-10), GHRP-1, GHRP-2, Hexarelin ou bien des molécules synthétiques à structure peptidomimétique : L692419 (Merck), NNC260610 (Novo Nordisk), EP51319 (Europeptides)...

La Ghrelin, ligand naturel du récepteur GHS-R (Growth Hormone Secretagogue Receptor) provenant des cellules de l'estomac et des vaisseaux sanguins n'a été identifiée qu'en 1999, d'abord chez le rat, puis chez l'homme et enfin chez certains autres mammifères (vaches, chèvres...) (Kojima *et al.*, 2001). C'est un peptide de 28 acides aminés comportant sur la sérine en position 3 un groupement acide n-octanoïque, seule modification de ce type connue sur un peptide et nécessaire à son activité sécrétagogue (Figure I-11).

Chez le cheval, il a été rapporté que l'usage de sécrétagogues augmentait les concentrations de GH circulantes. La première étude concerne l'administration par voie orale d'un sécrétagogue non peptidique (L-163255, Merck) qui a l'avantage de ne pas être dégradé par les enzymes digestives (Christensen *et al.*, 1997). Les autres concernent le sécrétagogue EP51389, un tripeptide (Kennedy *et al.*, 2002) et GHRP-6 (Borromeo *et al.*, 2005).

3.6.3. Sécrétion pulsatile de l'hormone de croissance

Chez l'homme comme dans toutes les espèces animales, GHRH et SRIF sont essentiels à la sécrétion pulsatile de l'hormone de croissance (Strobl et Thomas, 1994). La libération de GH à partir de l'antéhypophyse se produit en premier lieu en réponse à la stimulation par GHRH quand les taux de SRIF sont bas. La réponse hypophysaire est bloquée si les taux de SRIF sont élevés (Tannenbaum et Ling, 1984 ; Plotsky et Vale, 1985). La magnitude de la production de GH est modulée par des changements de sensibilité des cellules somatotropes de l'hypophyse à la somatostatine. La somatostatine et l'hormone de croissance font diminuer le taux de récepteurs à la somatostatine hypophysaire atténuant ainsi l'effet d'inhibition de la somatostatine au niveau de l'hypophyse.

Tableau I-5 : concentrations physiologiques de GH telles que rapportées dans la littérature pour le cheval, l'homme, le porc et le bovin

GH	Matrice	Population	Dosage	Concentrations moyennes (ng.mL⁻¹)	Auteurs
	plasma	cheval	RIA	5 (pics à 40)	(Thompson Jr <i>et al.</i> , 1992)
	plasma	poulain	RIA	10 à 25	(Stewart <i>et al.</i> , 1993)
		Juments		2,4	
	plasma	Étalons	RIA	8,6	(Thompson Jr <i>et al.</i> , 1994)
		hongres		8,5	
eGH	plasma	cheval	RIA	5 à 8	(Cahill <i>et al.</i> , 1994)
	plasma	cheval	RIA	1 à 8	(Christensen <i>et al.</i> , 1997)
	plasma	cheval	RIA	2-3	(Kennedy <i>et al.</i> , 2002)
	serum	cheval	RIA	5 (pics à 20)	(Dart <i>et al.</i> , 2003)
	plasma	cheval	ELISA	1 à 5	(Borromeo <i>et al.</i> , 2005)
	plasma	cheval	ELISA	0,5 à 5 (pics à 50)	(Borromeo <i>et al.</i> , 2007)
	-	Fœtus 12 sem.	-	20	
hGH	-	Fœtus 22 sem.	-	80	(Strobl et Thomas, 1994)
	plasma	homme	-	1 à 2	
	plasma	homme	ELISA	2 (15 effort)	(De Palo <i>et al.</i> , 2001)
pGH	plasma	porc	ELISA	1 à 8	(Secchi <i>et al.</i> , 1999)
	plasma	vache	ELISA	5 à 25	(Secchi <i>et al.</i> , 1988)
bGH	plasma	vache	ELISA	1 à 15	(Castiglio <i>et al.</i> , 2006)
	plasma	vache	ELISA	1 à 6	(Cisse <i>et al.</i> , 1991)
	plasma	vache	ELISA	8 à 10	(de Boer <i>et al.</i> , 1991)

Ce qui en retour augmente la capacité de réponse de l'hypophyse à la GHRH. La fréquence des pulses de GH est chez l'homme comprise entre plus d'un par heure à un pulse toutes les quatre heures (Casanueva, 1992). En général, les conditions physiologiques résultant d'une augmentation de la concentration de GH sérique en 24 heures sont associées à l'augmentation de l'amplitude des pulses plutôt qu'une augmentation de la fréquence des pulses. De la même manière, la réduction des taux circulants de GH chez les personnes âgées et chez les personnes de petite taille est associée à une diminution de l'amplitude des pulses sans changement de la fréquence. Les mécanismes de contrôle de l'amplitude des pulses de GH varient selon les différents états physiologiques de l'individu, à savoir le sommeil, l'exercice ou le stress (Strobl et Thomas, 1994).

Les données rapportées dans la littérature concernant la sécrétion pulsatile de GH pour le cheval (Thompson Jr *et al.*, 1992 ; Stewart *et al.*, 1993), le porc (Klindt et Stone, 1984) et le bovin (Breier *et al.*, 1986) indiquent un même mode de fonctionnement que celui observé chez l'homme. Il en est de même, pour la production d'un pulse de GH en réponse à des conditions physiologiques particulières d'exercice, de stimulation sexuelle, de stress alimentaire (Nadal *et al.*, 1997) et d'injection de GHRH chez le cheval (Thompson Jr *et al.*, 1992 ; Thompson Jr *et al.*, 1994).

3.6.4. Concentrations physiologiques de l'hormone de croissance

Comme décrit précédemment (§ 4.5.2), chez l'homme, l'hGH circule dans le plasma sous forme libre ou liée aux GHBP de haute et basse affinité. La quantification de la sécrétion physiologique de l'hGH peut s'envisager selon plusieurs approches : dosage du taux de base de hGH circulante dans le sang, calcul de la concentration intégrée nyctémérale de hGH ou étude de la pulsativité spontanée nyctémérale de hGH. Il semble que ces considérations soient préférentiellement appliquées à l'homme, car chez les animaux, les concentrations physiologiques de GH sont obtenues par dosage du taux de GH libre circulant. Le Tableau I-5 récapitule les valeurs de la littérature de GH libre moyennes basales obtenues dans le plasma pour le cheval, l'homme, la vache laitière et le porc. Les valeurs recensées indiquent que les concentrations circulantes de GH dans le plasma sont en moyenne situées entre 1 et 10 ng.mL⁻¹. Cette gamme de concentration classe l'hormone de croissance (lorsqu'elle n'est pas mesurée après un pulse naturel, un exercice physique (...)) parmi les composés se trouvant à l'état de trace dans le plasma.

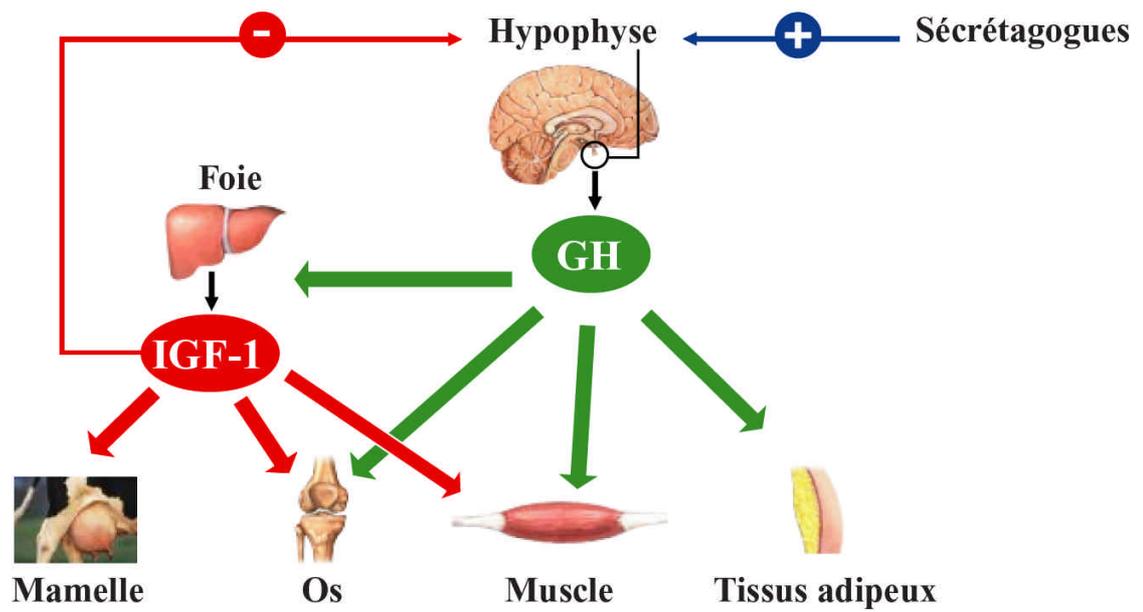


Figure I-12 : mode d'action de la GH sur ses tissus cibles

Chez l'homme, des concentrations intégrées sur 24 h de GH urinaires ont été mesurées avec le test ELISA NordiTest™ u-hGH autour de 4 ng.L⁻¹ (Saugy *et al.*, 1996). Cette très faible concentration s'explique parce qu'il n'y a qu'une infime partie de l'hormone de croissance qui est présente dans l'urine finale lors de la filtration glomérulaire (Johnson et Maack, 1977 ; Popii et Baumann, 2004). D'autre part, il est rapporté que la GH n'est stable dans l'urine humaine que pendant deux jours à température ambiante ou à 4 °C (Hourd et Edwards, 1994) mais qu'un stockage des échantillons de -20 à -80°C est favorable à la non dégradation de cette protéine pour augmenter le temps de conservation à 12 mois.

3.7. Mode d'action sur les tissus cibles et effets biologiques associés

3.7.1. Modalité d'action de l'hormone de croissance sur ses tissus cibles

Comme présenté Figure I-12, l'hormone de croissance agit de manière directe ou indirecte sur ses cellules cibles, situées sur différents organes et tissus.

3.7.1.1. Sur le foie

L'action directe de la GH sur les cellules du foie permet la synthèse d'un ensemble de facteurs d'origine hépatique, les somatomédines. Il s'agit de substances proches de l'insuline car apparentées structurellement à la proinsuline, dits « Insulin-like Growth Factors » (IGF). Les principales sont l'IGF-1 (SM-A ou somatomédine A) qui est un peptide de 70 acides aminés et l'IGF-2 (SM-C ou somatomédine C) qui est composé de 67 acides aminés. Elles sont véhiculées dans le sang par des protéines de transport (IGFBP ou IGF-Binding Protein) au nombre de 6 (IGFBP 1 à 6). Ces IGFBP modulent l'action des IGFs sur les tissus cibles (Jones et Clemmons, 1995). Dernièrement, une étude sur de jeunes chevaux sains (6-9 ans), visant à évaluer l'impact de l'administration de reGH sur les concentrations en IGF-1 dans le sérum et le liquide synovial a montré que suite au traitement à l'hormone de croissance, les concentrations en IGF-1 dans le liquide synovial étaient largement augmentées (Dart *et al.*, 2003).

3.7.1.2. Sur la mamelle

Le tissu mammaire contient d'abondants récepteurs pour les somatomédines et une très petite population de récepteurs à l'hormone de croissance. Les somatomédines ont des effets directs sur les cellules mammaires épithéliales et sont les médiateurs préférentiels de l'action de la somatotropine dans la glande mammaire (Etherton et Bauman, 1998).

3.7.1.3. Sur l'os

La GH peut réaliser dans une moindre mesure que l'IGF-1 la maturation des cellules germinales de l'os par une action directe sur le cartilage (Strobl et Thomas, 1994).

3.7.1.4. Sur le muscle

Les effets de l'hormone de croissance sur le muscle squelettique sont directs et indirects via l'IGF-1. L'IGF-1 stimule la prolifération de myoblastes (Houseknecht *et al.*, 1996).

3.7.1.5. Sur le tissu adipeux

L'action de l'hormone de croissance sur le tissu adipeux est considérée comme étant directe puisque les adipocytes contiennent des récepteurs à l'hormone de croissance (Etherton et Bauman, 1998).

3.7.2. Effets biologiques associés à la stimulation par l'hormone de croissance

L'hormone de croissance est une hormone pléiotrope (activités multiples) qui agit à la fois comme facteur de croissance (os et muscles), facteur de différenciation mais également régulateur métabolique (foie, tissu adipeux et muscles). Elle est donc un agent anabolisant physiologique indispensable à la croissance staturale et au maintien de la masse protéique chez l'adulte. Le déficit de GH, lorsqu'il survient avant la maturité sexuelle entraîne un nanisme. Son excès provoque avant la maturité sexuelle un gigantisme et après la maturité sexuelle de l'acromégalie (croissance en épaisseur des os au niveau des extrémités et de la face). Son action sur la croissance s'exerce de manière dépendante de la dose, ce qui n'est pas le cas d'autres hormones (insuline, hormones thyroïdiennes) qui participent aussi à la régulation de la croissance corporelle.

3.7.2.1. Effets directs

Un grand nombre d'effets métaboliques sont engendrés par l'action directe de l'hormone de croissance.

- L'hormone de croissance stimule l'anabolisme protéique à partir des acides aminés dont elle favorise le transport à l'intérieur de la cellule. En effet, une diminution des acides aminés utilisés par le foie facilite la disponibilité des acides aminés pour la synthèse protéique par les tissus périphériques et diminue la synthèse hépatique d'urée (Dubreuil *et al.*, 1999).

- C'est une hormone hyperglycémiant, diabétogène, c'est à dire qu'elle active la sécrétion de glucagon. L'administration prolongée de la GH peut entrainer une hyperglycémie se transformant parfois en diabète (Jeffcoate, 2000).

- Elle stimule la mobilisation des lipides qui sont catabolisés pour pourvoir aux besoins énergétiques de l'organisme, entraînant une augmentation des acides gras libres non-estérifiés (AGL ou NEFA : nonesterified free fatty acids) dans le plasma (Bauman *et al.*, 1982).

La glycogénèse peut s'effectuer à partir des lipides mobilisés (néoglucogénèse), ce qui accroît le pouvoir diabétogène de l'hormone de croissance. L'action de la GH sur la lipolyse est une action directe au niveau des tissus adipeux. Les effets sur le métabolisme des lipides varient selon la balance énergétique de l'animal : si le bilan est négatif, la mobilisation des lipides est augmentée (utilisation des réserves corporelles) et si le bilan est positif, la lipogénèse des tissus adipeux est diminuée (Baumann *et al.*, 1988 ; Chilliard *et al.*, 1998).

3.7.2.2. Effets indirects via les IGF-I

Les effets somatogènes sont ceux par lesquels l'hormone de croissance stimule indirectement la prolifération cellulaire. Les somatomédines vont alors permettre d'augmenter la croissance de l'os et du cartilage, stimuler la synthèse de protéines (Strobl et Thomas, 1994 ; Jones et Clemmons, 1995) et accroître les performances laitières (Peel et Bauman, 1987 ; Etherton et Bauman, 1998).

☞ *Effet sur la croissance de l'os et du cartilage*

Historiquement, chez l'homme, les effets de la GH sur les os et le cartilage ont été observés lors de cas cliniques où l'hormone de croissance était présente en excès (gigantisme) ou en défaut (nanisme). La croissance des os longs est réalisée à partir du cartilage de croissance, une structure histologique complexe permettant d'estimer avant la puberté comment seront les os lors de la vie d'adulte. C'est sur ce cartilage de croissance que l'IGF-1 va agir induisant la transformation de cellules germinales en cellules matures (chondrocytes) (Isaksson *et al.*, 1987).

Des travaux chez le cheval ont montré que l'administration de reGH avait un impact sur la vitesse de régénération de l'os (Price *et al.*, 2000). Les auteurs ont suivi l'évolution de la concentration de 3 marqueurs du tissu osseux : 2 marqueurs de la formation de l'os, PICP (type 1 collagen carboxyterminal propeptide) et OC (osteocalcine) et un marqueur de la résorption osseuse, ICTP (carboxyterminal cross-linked telopeptide du collagène de type 1). Une augmentation de la concentration des 3 marqueurs a alors été observée.

Cependant, des variations importantes inter-individus ont également été rapportées. Les auteurs suggèrent que le traitement à la GH pourrait être un très bon moyen pour accélérer la restructuration de l'os et du cartilage chez le cheval de course, de sport ou le cheval souffrant d'ostéoarthrite (Dart *et al.*, 2003).

☞ *Effet sur le muscle, la force et la vitesse de cicatrisation*

Chez l'homme adulte, déficient en GH et traité à l'hormone de croissance, il est observé une augmentation significative de sa masse corporelle (5 à 11 %) et associée à une augmentation de sa masse musculaire et de sa capacité à pratiquer des exercices physiques (Cuneo *et al.*, 1991b ; Cuneo *et al.*, 1991a). En effet, il a été suggéré que des modifications cardiaques sont responsables de l'augmentation de la capacité à réaliser des exercices physiques. La capacité de contraction du cœur et la masse du ventricule gauche sont augmentées après un traitement à la GH chez les personnes déficientes en GH (Cuneo *et al.*, 1991c). Néanmoins et ce malgré les améliorations observées, les patients déficients GH traités à la GH n'ont pas atteint le niveau de performances physiques observé pour les personnes saines de même âge (Jorgensen *et al.*, 1991). D'autre part, il a été montré que l'administration de rhGH à des enfants augmentait la vitesse de cicatrisation de brûlures cutanées (Gilpin *et al.*, 1994).

Chez le cheval âgé (>20 ans), il a été montré que l'administration de reGH améliorait la musculature des animaux sans pour autant déterminer si cet effet était accompagné d'une augmentation de leur force ou de leur performance physique (Malinowski *et al.*, 1997). Des études sur la vitesse de cicatrisation de blessures aux membres des chevaux ont indiqué que l'administration de reGH n'avait pas un impact significatif sur la guérison immédiate de la blessure (Smith *et al.*, 1999) mais que la vitesse de guérison était augmentée lorsque les blessures survenaient après l'arrêt du traitement sans pouvoir en apporter une preuve concrète (Dart *et al.*, 2002).

Chez le porc sain, il a été montré qu'un traitement à la pGH pouvait augmenter le pourcentage de la masse musculaire des animaux de près de 30 %, diminuer les graisses de 20 à 80 % tout en diminuant leur ration alimentation de près de 15 % (Etherton, 1999a). Il semble que les informations obtenues lors de l'administration de GH à des porcs sains indiquent que le traitement permet à la fois d'augmenter la synthèse protéique et d'augmenter l'efficacité avec laquelle les acides aminés sont utilisés pour synthétiser des protéines (Etherton et Bauman, 1998) tout en diminuant la masse grasseuse.

☞ *Les effets à court terme sur les performances laitières*

Chez le bovin allaitant, les cellules lactogènes isomérisent une partie du glucose sanguin en galactose afin de former du lactose : c'est un effet indirect de l'hormone de croissance sur la lactation *via* les IGF-I. La quantité de lait augmente graduellement les premiers jours du traitement à la rbGH, atteignant le maximum autour du 6^{ème} jour (Peel et Bauman, 1987). L'amplitude de la réponse en terme de production de lait est fonction de la dose de rbGH administrée et le maximum est atteint pour une dose de 30 à 40 mg/jour/animal. Après le pic de lactation, pendant moins de quatre semaines, se produit un accroissement de la production laitière d'environ 4 kg/jour, sans augmentation du niveau d'ingestion d'aliments (Chilliard *et al.*, 1998). L'augmentation de la production peut être due à une amélioration de l'efficacité de la digestion des aliments et à une meilleure répartition des nutriments vers la glande mammaire pour la synthèse du lait (Peel et Bauman, 1987). Le facteur majeur affectant la réponse est fortement lié à la santé du bétail, au programme de nutrition et aux conditions environnementales de l'élevage (Chilliard, 1989 ; Bauman, 1992).

☞ *Les effets à long terme sur les performances laitières*

L'influence du traitement permet d'augmenter la production de lait de plus de 2,8 à 11 kg/jour soit environ une augmentation de 10 à 30 % et la composition du lait ne varie quasiment pas (Chilliard, 1989). Il est intéressant de noter, que selon Gallo (Gallo *et al.*, 1997), les vaches fortes productrices génétiquement répondent moins bien que les faibles productrices à l'administration de rbGH au niveau de l'augmentation de la quantité de lait obtenue. D'un point de vue sanitaire, une augmentation du risque de mammites cliniques de 25% est observée (Willeberg, 1994), entraînant après traitement aux antibiotiques un risque de résidus dans les produits laitiers. De plus, des conséquences sur les tendons de certains animaux traités ont été observées provoquant des cas de « boiteries ».

3.8. Clairance de la GH

Chez l'homme, des études de métabolisme par marquage isotopique de la GH ont été réalisées pour comprendre comment l'hormone de croissance était éliminée de l'organisme (Johnson et Maack, 1977). Environ 65 % de la clairance de la GH est réalisée *via* la filtration glomérulaire et la dégradation de la GH se fait dans les cellules du tubule proximal, où seule de la monoiodotyrosine marquée a été retrouvée (Johnson et Maack, 1977). En raison du processus de dégradation très efficace de la GH dans le rein, il n'y a qu'une infime partie de l'hormone de croissance intacte qui soit éliminée dans l'urine (Popii et Baumann, 2004).

4. LES HORMONES RECOMBINANTES ET LEURS UTILISATIONS POTENTIELLES

4.1. Historique

Dès les années 50, la synthèse chimique de peptides est élaborée par Bruce Merrifield (Merrifield, 1951). Ensuite, il apparaît dans la littérature la synthèse chimique de peptides à activité hormonale. En effet, en 1953, Du Vigneaud, annonce la synthèse d'un octapeptide possédant l'activité hormonale de l'ocytocine (Du Vigneaud *et al.*, 1953). A cette époque, et ce pour des raisons de faisabilités techniques, seuls les peptides contenant moins de 20 résidus d'acides aminés étaient synthétisés. La plupart des hormones protéiques présentent une taille plus importante (100 à 200 résidus) et nécessitent une structure tertiaire bien précise pour être active. Devant l'incapacité des chimistes à résoudre ces problèmes, la production s'est d'abord tournée vers l'extraction à partir d'organes animaux, avec des limitations diverses comme notamment l'insuline porcine ou bovine, actives chez l'homme mais avec risques de réactions immunes importantes. D'autre part, bien que l'extraction des organes soit faite en général à partir de glandes d'animaux dans les abattoirs, l'hormone de croissance humaine est obtenue en prélevant, des hypophyses humaines sur des cadavres par des techniciens mortuaires ou des étudiants en médecine dans les hôpitaux, d'où des quantités disponibles restreintes et un coût de traitement très élevé pour le patient.

C'est en juin 1985, après l'évaluation du risque de contamination de lots de hGH extraites d'hypophyses par le prion de la maladie de Creutzfeldt-Jacob, que des pays comme la Grande Bretagne et les États-Unis ont décidé de développer à grande échelle la synthèse d'hormone de croissance humaine recombinante et d'arrêter de distribuer les produits provenant d'hypophyses humaines. C'est à partir de cette date que débute le scandale de l'hormone de croissance en France. En effet, les autorités françaises sur l'avis de l'institut Pasteur et de l'institut France-Hypophyse ont continué de délivrer des doses de GH à des enfants jusqu'au mois de Mars 1986. Pendant ces quelques mois, sur environ 50 enfants traités, 40 décédèrent (Dorozynski, 1997). Devant ces conditions, l'intérêt de produire des hormones par des procédés biotechnologiques dont l'avantage considérable est de permettre une production massive (100 000 molécules par bactérie) en quasi innocuité s'est très vite imposé. De plus, avec la mise sur le marché de traitements à l'hormone de croissance recombinante humaine, l'industrie pharmaceutique a ensuite très vite développé des spécialités d'hormones de croissance recombinantes bovines, équine et porcines pour accroître la rentabilité en production animale.

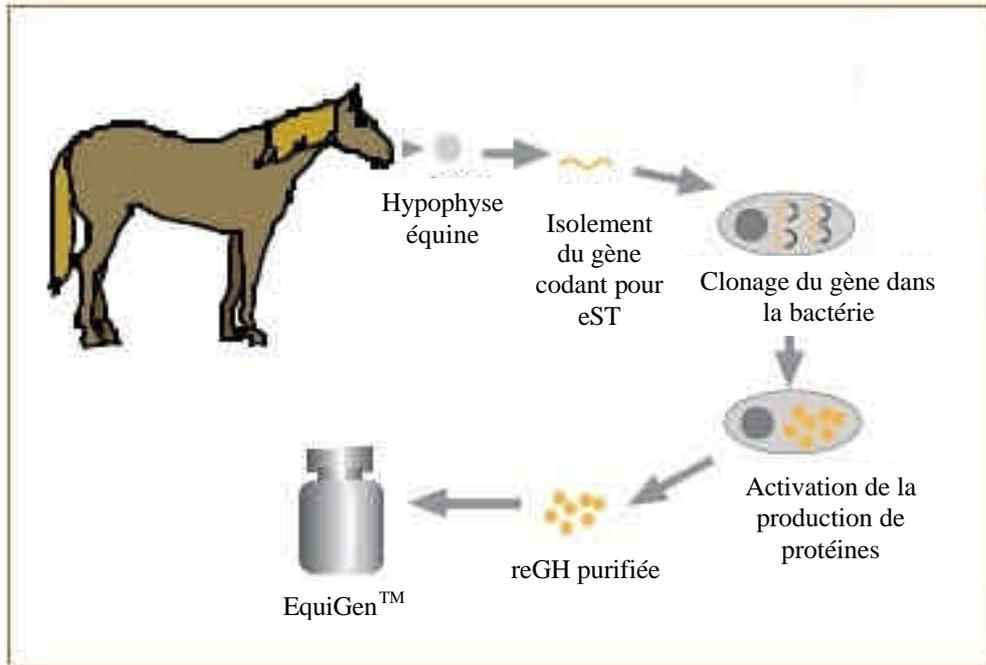


Figure I-13 : processus d'obtention de l'hormone de croissance équine recombinante

4.2. Synthèse des hormones recombinantes par génie génétique

La première hormone produite par génie génétique a été la somatostatine (14 résidus) par Aharonowitz et Cohen en 1981 (Aharonowitz et Cohen, 1981).

4.2.1. Principe général de synthèse des hormones de croissance recombinantes

Quelle que soit l'espèce animale considérée, le principe de création d'une protéine recombinante est le même (Figure I-13). Pour produire massivement une protéine d'intérêt, son ARNm correspondant doit d'abord être isolé, extrait de tissus hypophysaires dans le cas particulier de la GH, puis à l'aide de la transcriptase inverse son ADN complémentaire (ADNc) doit être obtenu. L'ADN double brin obtenu est introduit dans une cellule procaryote comme *Escherichia coli* (George *et al.*, 1985 ; Stewart et Tuffnell, 1991 ; de Oliveira *et al.*, 1999) ou eucaryote : cellules de mammifère ((Hwang *et al.*, 1992 ; Ouyang *et al.*, 2003), de levure (Jo *et al.*, 1996) ou d'insecte (Ouyang *et al.*, 2000 ; Ouyang *et al.*, 2002). Dans ce dernier cas, l'hormone est sécrétée dans le milieu de culture au lieu de rester dans la bactérie, par conséquent sa purification en est facilitée. Lors de la construction moléculaire du vecteur plasmidique, afin de permettre l'expression dans la bactérie *Escherichia coli* du cadre ouvert de lecture correspondant à l'hormone de croissance mature que l'on souhaite produire, il faut introduire en amont les signaux nécessaires à sa traduction dans une cellule procaryote.

La séquence de l'hormone de croissance débutant par une phénylalanine spécifiée par un codon TTC, il est nécessaire d'ajouter immédiatement en amont un codon de démarrage (initiation) ATG. Il faut également prévoir, une séquence dite de « Shine-Dalgarno », pour permettre la fixation du ribosome et réaliser la traduction de l'ARNm en protéine. L'ajout du codon de démarrage conduit alors à l'insertion d'une méthionine en position N-terminale. **C'est pourquoi, la majorité des hormones de croissance recombinantes possèdent une méthionine en position N-terminale.** Il est possible d'éliminer en théorie cette méthionine par la méthionine-aminopeptidase (MAP), naturellement présente dans la bactérie, mais la production en grande quantité de l'hormone recombinante fait que globalement la méthionine reste liée. La composition des acides aminés adjacents à la méthionine joue aussi un rôle dans la déméthionylation de la protéine (Hirel *et al.*, 1989). De plus, le maintien de cet acide aminé surnuméraire ne nuit aucunement à l'activité biologique de l'hormone puisque la partie N-terminale de la somatotropine est très éloignée des domaines de fixation aux récepteurs.

Tableau I-6 : hormones de croissance disponibles sur le marché, fournisseurs et différences entre les formes naturelles et recombinantes en tenant compte principalement de la partie N-terminale des molécules

bGH hypophysaire : Harbor-UCLA Medical Center 191 AA (21777 Da) 191 AA (21791 Da) 190 AA (21706 Da) 190 AA (21720 Da)	1 2 Ala-Phe Ala-Phe Phe Phe 1	127 ...-Val-... ...-Leu-... ...-Val-... ...-Leu-... 126
bGH recombinantes : LG Life-Science (<i>Hilac</i> [®]) Upjohn (<i>Somavubove</i> [®]) 191 AA (21791 Da) Monsanto (<i>Sometribove</i> [®]) (<i>Lactotropin</i> [®]) 191 AA (21851 Da) Cyanamid (<i>Somagrebove</i> [®]) 193 AA (22094 Da) Elanco (<i>Somidobove</i> [®]) 199 AA (22796 Da)	Ala-Phe Met-Phe Met-Asp-Gln-Phe Met-Phe-Pro-Leu-Asp-Asp-Asp-Lys-Phe	...-Leu-... ...-Leu-... ...-Leu-... 129 ...-Leu-...
eGH hypophysaire : Harbor-UCLA Medical Center 190 AA (21757 Da)	Phe-Pro	
eGH recombinante: BresaGen (<i>EquiGen</i> TM) 191 AA (21888 Da)	Met-Phe-Pro	
pGH hypophysaire : Harbor-UCLA Medical Center 191 AA (21802 Da)	Ala-Phe	
pGH recombinante : Alpharma (<i>Reporcin</i> [®]) 190 AA (21730 Da)	Phe	
hGH recombinante : GeneScience (<i>Jintropin</i> [®]) Genentech (<i>Nutropin</i> [®]) Genentech (<i>Genotropin</i> [®]) Eli Lilly (<i>Humatrope</i> [®]) Serono (<i>Saizen</i> [®]) Serono (<i>Serostim</i> [®]) Serono (<i>Zorbitive</i> [®]) Novo Nordisk (<i>Norditropin</i> [®]) Ferring Pharma (<i>Zomacton</i> [®]) AnkeBio (<i>Ansomone</i> [®]) TEVA Pharma (<i>Tev-Tropin</i> [®]) Kexing (<i>Fitropin</i> [®]) 191 AA (22125 Da)	Phe	

4.2.2. Les hormones de croissance recombinantes mises sur le marché

Comme synthétisé dans le Tableau I-6, réalisé en partie à partir des informations collectées par Scippo (Scippo *et al.*, 1997), Pinel (Pinel *et al.*, 2004) et Castigliero (Castigliero *et al.*, 2006), les hormones de croissance recombinantes humaine, bovine, porcine et équine produites par l'industrie pharmaceutique ont une composition très proche en acides aminés par rapport à leur forme endogène, voire identique dans le cas de l'hormone de croissance humaine. Il a été dénombré au moins 5 formules retards applicables aux bovins. Hilac[®] et Somavubove[®] sont identiques à une des formes circulantes, Sometribove[®] ne se différencie que par la substitution de l'alanine en position 1 par une méthionine et Somagrebove[®] et Somidobove[®] se différencient des formes circulantes par des acides aminés surnuméraires. Une seule spécialité existe pour le cheval, EquiGen[™], elle se différencie de la forme endogène par une méthionine additionnelle. Pour le porc, Reporcin[®], formule retard, se différencie de la forme endogène par la délétion de l'alanine en position 1. Pour l'homme, au moins 12 spécialités sont mises sur le marché : Jintropin[®], Nutropin[®], Genotropin[®], Humatrope[®], Saizen[®], Serostim[®], Zorbitive[®], Norditropin[®], Zomacton[®], Ansomone[®], Tev-Tropin[®], Fitropin[®], toutes identiques en séquence à la forme 22 kDa.

Les produits disponibles sur internet sous la dénomination « hormone de croissance » sont en réalité bien souvent des mélanges d'acides aminés, principalement arginine (inhibiteur de la somatostatine), glutamine et glycine ou des peptides sécrétagogues supposés stimuler la sécrétion d'hormone de croissance hypophysaire. Ils sont présentés sous la forme de spray, de gélules, de chewing-gum ou de poudre effervescente : ils sont donc destinés à une utilisation orale exclusive (Pinel, 2003). L'hormone de croissance étant une macromolécule protéique, elle est incapable de franchir la muqueuse buccale et son ingestion se traduirait par une hydrolyse enzymatique lors de sa digestion dans l'estomac. Son administration ne peut donc être réalisée que par injection.

4.3. Réglementation

4.3.1. Pour le bovin

L'utilisation de l'hormone de croissance est légale aux Etats-Unis depuis que le traitement des vaches à la rbGH a été approuvé en Février 1994 par la Food and Drug Administration (FDA) et a été très largement utilisé jusqu'à aujourd'hui ainsi que dans plus d'une trentaine de pays dans le monde.

Cependant, l'utilisation de l'hormone de croissance comme promoteur de la production de lait ou de viande chez le bovin n'est pas autorisée dans les pays de l'Union Européenne conformément à l'article premier de la Décision 1999/879/CE (JOCE, 1999) : « ...les états membres veillent à interdire la mise sur le marché de la somatotropine bovine en vue de sa commercialisation et son administration sur le territoire de la Communauté, par quelque moyen que se soit, aux vaches laitières. ». Cette directive est basée sur le rapport produit par le Comité Scientifique de la Santé et du Bien être des Animaux (CSSBA) et a été adoptée le 10 Mars 1999 où le comité affirme que la bGH accroît le risque de mammite clinique, augmente également le risque d'affection du pied et des membres et qu'elle peut affecter négativement la reproduction et provoquer de graves réactions au site d'injections. C'est pourquoi, à la lumière de cet avis, il est interdit pour des raisons liées à la santé et au bien être des animaux, la commercialisation et l'utilisation de la bGH dans la communauté à partir du 1^{er} Janvier 2000, conformément aux dispositions de la Décision 98/58/EC (JOCE, 1998) concernant la protection des animaux d'élevage.

4.3.2. Pour le porc

La législation appliquée aux porcs est la même que celle appliquée aux bovins dans l'Union-Européenne.

4.3.3. Pour le cheval

Chaque année, la Fédération Internationale des Autorités Hippiques des courses au galop (IFHA) publie l'accord international sur l'élevage et les courses (www.horseracingintfed.com). Cet accord a pour but d'orienter les autorités hippiques reconnues dans la révision de leur « Code des Courses » et de leur réglementation d'élevage, permettant ainsi une homogénéisation de cette réglementation. L'objectif est de maintenir le niveau de qualité des courses et de l'élevage en contrôlant l'utilisation de substances capables de conférer à un cheval lors d'une course, un avantage ou un désavantage. En effet, il ne faut pas perdre de vue qu'il peut arriver que certaines substances soient administrées à l'animal afin de diminuer ses performances. L'article 6 (Annexe I : III : substances prohibées) de l'accord international sur l'élevage et les courses définit le dopage comme l'administration de substances prohibées.

Substances prohibées :

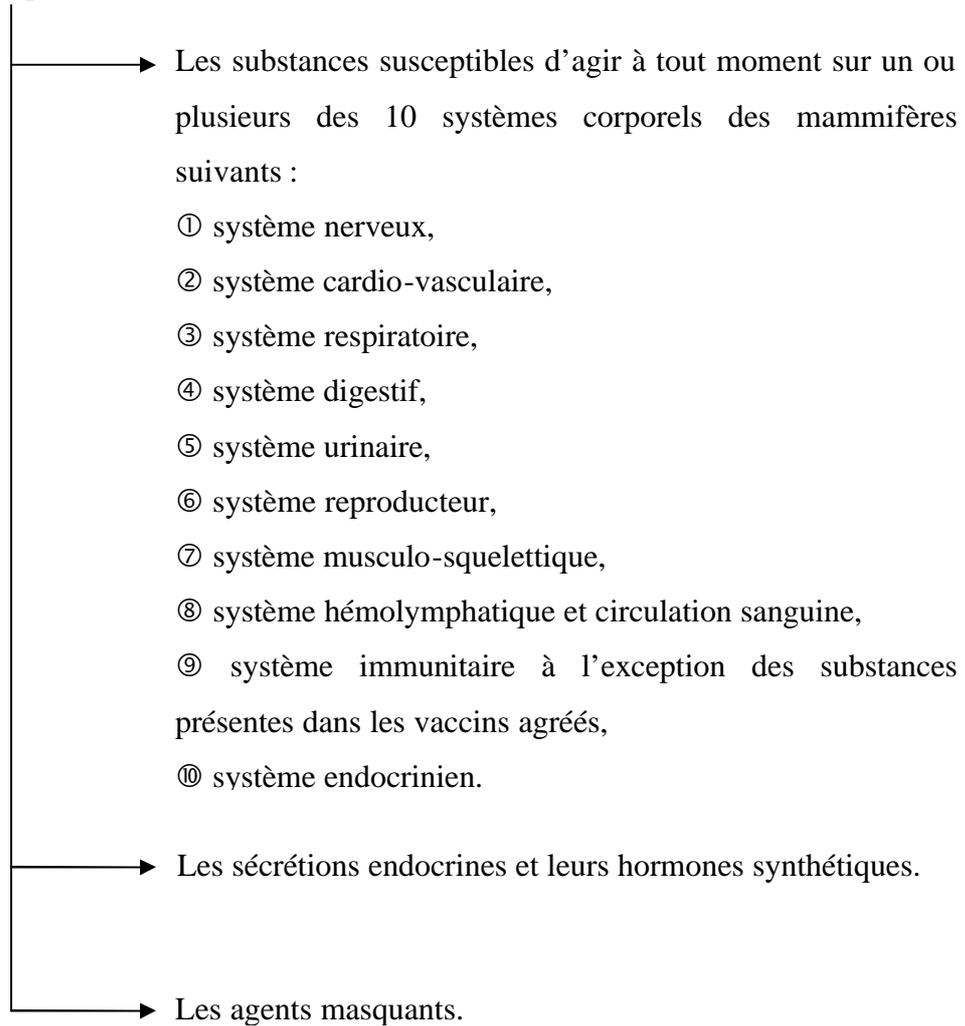


Figure I-14 : les 3 catégories de substances prohibées selon l'article 6 du code des courses

Il n'y a pas une liste exhaustive de molécules classées suivant leurs propriétés pharmacologiques, comme cela est le cas chez l'homme. Dans le domaine hippique, la définition est basée sur les conséquences de l'administration de la substance sur l'organisme. Ainsi, les substances prohibées sont réparties en trois catégories (Figure I-14) où un agent masquant est défini comme une substance dont l'administration va fausser la détection d'une substance prohibée. A titre d'exemple, les diurétiques peuvent être utilisés lors des compétitions pour diluer les urines de l'animal afin de fausser la détection d'autres substances administrées, en diminuant leurs concentrations dans les urines.

4.3.4. Pour l'homme

L'utilisation de l'hormone de croissance pour améliorer les performances des athlètes est strictement interdite en France conformément au Décret 2003-514 (JO, 2003) où l'hormone de croissance appartient à la classe E des substances interdites, c'est-à-dire « *hormones peptidiques, substances mimétiques et analogues* ». L'hormone de croissance figure aussi en partie S2 « *hormones et substances apparentées* » du code mondial antidopage. La liste des produits interdits est mise à jour chaque année par le Comité International Olympique (CIO) et est consultable en libre accès sur le site internet de l'Agence Mondiale Antidopage (AMA – www.wada-ama.org/fr/t1.asp).

5. ADMINISTRATION DE GH HÉTÉROLOGUE

De par la forte homologie de séquence qu'il existe entre les hormones de croissance issues de différentes espèces (Tableau I-3, p24), il semble possible de pouvoir réaliser des administrations hétérologues d'hormone de croissance à des animaux et d'en observer les effets comme par exemple administrer de l'hormone de croissance porcine ou bovine à un cheval. Cette étude a été réalisée pour la première fois par l'équipe de Buomono en 1996 (Buomono *et al.*, 1996), les résultats indiquent que la rbGH (sometribove[®]) et la rpGH (spécialité NC) sont biologiquement actives chez les chevaux et pourraient donc être utilisées à des fins thérapeutiques. Les auteurs rapportent que les formulations retard huileuses sont assez mal supportées par les chevaux car ils développent d'importantes réactions inflammatoires au point d'injection. En 2001, le laboratoire antidopage des chevaux d'Afrique du Sud (de Kock *et al.*, 2001b) a réitéré cette expérimentation en comparant les effets de l'administration de rbGH (Hilac[®]), de rpGH (Reporcin[®]) et de reGH (EquiGen[®]) sur 12 chevaux pur-sang réformés de course (3 chevaux pour chaque préparation testée et 3 chevaux contrôles).

Cette équipe a montré grâce à l'augmentation des concentrations de marqueurs indirects de la GH (IGF-1 et IGFBP-3) que les hormones hétérologues rbGH et rpGH étaient aussi actives que la reGH, confirmant les résultats obtenus par Buomono en 1996. Au cours de cette expérimentation, les auteurs rapportent que les injections de reGH et de rbGH sont assez bien supportées mais que les 3 chevaux ayant reçu de la rpGH ont montré de lourdes réactions d'inflammation au point d'injection.

D'autre part, il a été saisi en 2004 à l'Institut du Sport Australien, dans la chambre du cycliste australien Mark French, des flacons contenant de l'hormone de croissance (recombinante) équine, suggérant que celui-ci devait s'en servir comme dopant. Depuis peu, l'hormone de croissance (recombinante) équine figure sur la liste des produits interdits par l'Agence Mondiale Antidopage (inscrit sur la liste depuis le 01/01/2007).

6. LES ANIMAUX GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉS

Avec l'évolution des biotechnologies, il peut être envisagé de produire des animaux génétiquement modifiés, c'est-à-dire ayant reçu dans leur patrimoine génétique un gène pouvant surexprimer l'hormone de croissance de manière à augmenter sa concentration dans le sang. Cela pourrait être envisagé pour améliorer l'efficacité de production des animaux d'élevage. Ce travail a été réalisé pour la première fois sur des souris en 1982 par Palmiter (Palmiter *et al.*, 1982). Les auteurs ont microinjecté un gène de fusion contenant le gène de l'hormone de croissance de rat dans le pronucleus mâle d'un œuf de souris fécondé. Les œufs ont ensuite été implantés dans une femelle pseudogestante. Le gène a été incorporé avec réussite dans le génome d'un petit nombre de souris. Ces dernières l'ont alors transmis à leur descendance de façon stable selon le modèle Mendélien. Les auteurs ont constaté qu'après trois semaines, les souris transgéniques grandissaient beaucoup plus vite que les témoins non transgéniques pour atteindre quasiment une taille adulte mais sans pour autant avoir la maturité sexuelle. Depuis cette époque, de nombreux clones ont été réalisés sur des souris notamment à partir de gènes provenant d'autres espèces : humain (Palmiter *et al.*, 1983 ; Yun *et al.*, 1990), bovin (Chen *et al.*, 1991), ovin (Orion *et al.*, 1989). En 1993, Pursel et Solomon ont publié leurs résultats sur la surexpression de somatotropine chez des porcs transgéniques ; il apparaît que les porcs contenant le gène de la bGH n'atteignent pas une taille plus importante que les animaux témoins mais ils observent une augmentation de la vitesse de croissance de l'ordre de 13 % avec une efficacité alimentaire augmentée de 18 % et une diminution du tissu adipeux de 85 %.

Tableau I-7 : méthodes d'incorporation de la GH en thérapie génique

Méthodes utilisées	Stratégie d'incorporation du gène
<i>Ex vivo</i>	Kératinocytes
	Fibroblastes
	Cellules endothéliales
	Cellules mesothéliales péritonéales
	Cellules du muscle squelettique
	Cellules de fibroblastes encapsulées*
<i>In vivo</i>	Injection d'adénovirus
	Injection d'ADN plasmidique

* Les cellules génétiquement modifiées sont contenues dans des petites capsules de céramique poreuses, placées sous la peau. Le système d'encapsulation est perméable et les cellules peuvent donc recevoir les nutriments permettant la libération dans l'organisme de la GH. L'avantage de ce système est la protection des cellules contre le système immunitaire (Peroni *et al.*, 2005 ; Audran, 2006).

Par conséquent, ces informations suggèrent que le taux élevé de somatotropine dans le sang modifie la vitesse de croissance et la composition du corps de l'animal transgénique. Il convient néanmoins de noter que le coût de production d'un animal transgénique est considérable parce qu'il n'y a environ que 1 % des microinjections dans les embryons qui conduisent à un animal transgénique et 40 % de ceux-ci n'expriment en outre pas le transgène. Cependant, Etherton (Etherton, 1999b) pense que grâce à l'isolation récente des cellules souches embryonnaires de porc (ES), il sera plus facile de produire des cellules ES-transgénique pour obtenir un taux d'introduction de gène étranger avec beaucoup plus d'efficacité, donc à un coût moindre. Alors que l'utilisation d'animaux transgéniques peut être envisagée comme une approche potentielle pour augmenter la production de viande, de lait ou la vitesse de croissance, une autre stratégie d'incorporation d'un gène exogène dans les cellules d'un animal sans l'utilisation de transgénèse peut être réalisée *via* la « thérapie génique ».

7. THÉRAPIE GÉNIQUE APPLIQUÉE À LA GH

Cette technique, initialement développée pour remplacer dans une cellule un gène défectueux par un gène normal et fonctionnel qui sera à l'origine de la synthèse de la protéine manquante ou défectueuse, s'est élargie et l'on entend aujourd'hui par thérapie génique toute introduction dans une cellule de matériel génétique comme moyen thérapeutique, qu'il s'agisse d'un gène, d'une portion de gène, d'ADN, d'ARN, d'oligo-nucléotides (Audran, 2006). Dans le cas d'une thérapie génique à la GH, l'idée repose sur le fait que le gène d'intérêt (GH) est incorporé dans un vecteur (rétrovirus, adénovirus, liposomes...) qui ciblerait idéalement l'ADN des cellules désirées et le résultat conduirait à une augmentation du niveau de l'expression du gène codant pour l'hormone de croissance. Pour se faire, il existe deux façons d'opérer : la première consiste à prélever des cellules (méthode *ex vivo*) et à les modifier avant de les réintroduire dans l'organisme ; la seconde (méthode *in vivo*) consiste en une administration locale du transgène. De très nombreux travaux (au moins 40 articles) ont été publiés et une synthèse en est présentée dans le Tableau I-7 grâce aux informations publiées par Peroni en 2005 (Peroni *et al.*, 2005). La plupart des travaux rapportés ont utilisé des souris ou des rats comme espèces modèles. Néanmoins, il est rapporté que l'insertion du gène codant pour l'hGH dans la glande mammaire d'une chèvre au moyen d'un rétrovirus conduit à des taux très importants de GH proche de 60 ng.mL^{-1} dans le lait lorsque celle-ci est en période de lactation (Archer *et al.*, 1994).

8. CONCLUSION DE LA PREMIÈRE PARTIE

L'hormone de croissance a été exhaustivement étudiée depuis près de 60 ans notamment en ce qui concerne ses mécanismes d'action et ses effets physiologiques potentiellement intéressants en élevage ou dans le domaine sportif. Avec l'émergence des protéines recombinantes à la fin des années 1980 et leur fabrication industrielle au début 1990, il a été possible de produire de grandes quantités de ces hormones en fonction des espèces que l'on voulait stimuler. L'utilisation de certaines d'entre elles est légale aux Etats-Unis et dans plus d'une trentaine d'autres pays depuis que le traitement des vaches laitières à la bGH a été approuvé en Février 1994 par la Food and Drug Administration (FDA). Cependant la réglementation européenne en ce qui concerne l'utilisation de l'hormone de croissance recombinante pour améliorer la croissance de bovins, de porcs, augmenter la production de lait ou pour modifier la masse musculaire des animaux de compétition est très stricte. Il est donc indispensable de mettre en place des outils de détection de cette utilisation illégale c'est à dire être en mesure d'assurer la discrimination de la somatotropine d'origine endogène de la somatotropine recombinante présentes toutes deux à l'état de trace (1 à 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) dans le plasma, matrice biologique particulièrement complexe et riche en protéines.

PARTIE - 2 MISE EN ÉVIDENCE DE L'UTILISATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE

1. INTRODUCTION

Comme présenté dans la partie précédente, l'hormone de croissance est une protéine de 22 kDa dont les concentrations physiologiques attendues sont de l'ordre de 1 à 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le plasma et de quelques ng.L^{-1} pour l'urine. Pour détecter une administration d'hormone de croissance recombinante, il est possible d'utiliser des méthodes analytiques indirectes (bio-essais, tests immunoenzymatique (ELISA) ou radioimmunologiques (RIA)) ou des méthodes analytiques directes de détection de rGH et discrimination par rapport à la forme native nécessitant l'utilisation d'un protocole de purification de protéines suffisamment performant pour permettre l'identification de la molécule à l'état de trace avec une bonne spécificité (pour interdire tout faux positifs) et une grande sensibilité (pour éviter trop de faux négatifs) grâce à la spectrométrie de masse. D'autre part, l'administration d'hormone de croissance peut être mise en évidence au moyen de biomarqueurs secondaires comme l'IGF-1, l'IGFBP-3 ou des anticorps anti-GH recombinante. Les principales données de la littérature concernant l'intérêt, l'utilisation et la mise en œuvre de ces méthodes seront développées dans cette partie.

2. MATRICES BIOLOGIQUES D'INTÉRÊT

La mise au point d'un protocole de purification performant de l'hormone de croissance est conditionnée par la connaissance de la composition des matrices dans laquelle la purification sera entreprise. Les matrices biologiques d'intérêt sont dans ce contexte le sang et l'urine.

2.1. Le sang

Le sang, liquide hétérogène, est un tissu conjonctif constitué d'un milieu extracellulaire abondant et d'éléments figurés : les hématies (érythrocytes ou globules rouges), les leucocytes (globules blancs), les thrombocytes (plaquettes). Tous ces éléments sont issus d'une même cellule souche présente en petite quantité dans la moelle osseuse.

A l'issue du prélèvement sanguin, si le sang est collecté dans un tube sec (sans anticoagulant) alors le fibrinogène se transforme en fibrine et il y a formation d'un caillot, la phase liquide formant le sérum.

Tableau I-8 : classe de protéines et pourcentages associés en fonction des espèces (Gautier, 1979)

	Albumines (%)	Globulines (%)			
		a₁	a₂	b	g
Humain	60	5	8,5	11	9,5
Équin	37 - 45	4 - 5	9 - 12	18 - 22	21 à 29
Bovin	37 - 50	13 - 14	8 - 10	28 - 40	

En revanche, si le sang est prélevé dans un tube contenant un anticoagulant (héparine), il faut réaliser une centrifugation pour obtenir deux phases : le plasma et un culot globulaire (différent d'un caillot). Généralement, le sérum est utilisé pour les dosages sérologiques ou l'étude des protéines sériques tandis que le plasma est préférentiellement utilisé pour réaliser une analyse de groupage sanguin ou d'hémostase.

Le plasma, fraction liquide du sang, de couleur citrine est constitué d'eau (90 %) et renferme divers ions, des protéines et quelques constituants organiques non protéiques. Chez l'humain, l'équin et le bovin, les principales protéines constituantes du plasma sont présentées dans le Tableau I-8, exprimées en pourcentage de protéine totale. Généralement, la concentration en protéine totale du plasma est estimée chez l'homme entre 60 et 80 g.L⁻¹ et pour le cheval et le bœuf de 70 à 90 g.L⁻¹. Les albumines interviennent dans l'équilibre osmotique et assurent le transport de nombreuses substances hydrosolubles ou non (la sérum albumine est capable de transporter des anions minéraux (Cl⁻, I⁻), certains médicaments, certaines enzymes, des acides gras...). Les globulines représentent un ensemble complexe de protéines pouvant être classées selon leur rôle physiologique :

- transporteur de lipides, d'hormones stéroïdes
- constituants du complément (C₁ à C₉)
- hormones protéiques (hormones antéhypophysaires, insuline...)
- enzymes (phosphatases, transaminases, lipases, amylases...)
- facteurs de coagulation et de la fibrinolyse en rapport avec l'hémostase

2.2. L'urine

L'urine provient des reins où l'unité fonctionnelle est le néphron dont il en existe environ un million dans le rein humain. La formation de l'urine s'y déroule en trois étapes :

➤ Ultrafiltration : dans le glomérule, l'urine primitive est formée par ultrafiltration du plasma et lui est isotonique. Les pores à travers lesquels passe le plasma ont un diamètre effectif moyen d'environ 2,9 nm. Ceci permet à tous les composants plasmatiques jusqu'à une masse molaire de 5 kDa de passer librement. Pour des valeurs croissantes de masse molaire, les molécules sont retenues, mais seules les molécules de MM > 68 kDa ne peuvent plus du tout passer dans l'urine primitive. Les protéines plasmatiques dont la masse est en générale supérieure à 54 kDa ne se retrouvent donc qu'en très faible quantité dans l'urine.

Tableau I-9 : composition des différents minéraux constituant l'urine équine normale

Minéraux abondants dans l'urine	Formules
Carbonate de calcium	CaCO ₃
Oxalate de calcium dihydrate	CaC ₂ O ₄ , 2H ₂ O
Hydrogénophosphate de calcium dihydraté	CaHPO ₄ , 2H ₂ O
Hydroxy-apatite	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂

Tableau I-10 : exemples d'application de bio-essais appliqués à la GH

Type de bio-essai	Sujet d'application	Type de GH	Auteurs
Gain de poids du rat hypophysectomisé	Détection de l'activité hormone de croissance dans des hypophyses de chevaux	eGH	(Saxena et Henneman, 1966)
	Détection de l'activité de l'hormone de croissance humaine recombinante	Met-hGH	(Jung <i>et al.</i> , 2005)
Test du tibia	Détection d'hormone de croissance dans des hypophyses bovines	bGH	(Kwa <i>et al.</i> , 1965)
	Détection d'hormone de croissance dans des hypophyses de chevaux	eGH	(Conde <i>et al.</i> , 1973)
Cellules Nb2	Dosage hGH dans le plasma	hGH	(Ishikawa <i>et al.</i> , 2000)
	Détection de l'activité de l'hormone de croissance canine recombinante	cGH	(Ascacio-Martinez et Barrera-Saldana, 2004)
	Détection de l'activité de l'hormone de croissance de poulet glycosylée	G-cGH	(Berumen <i>et al.</i> , 2004)

- **Réabsorption** : l'urine primitive est fortement concentrée grâce à la réabsorption d'eau. Simultanément, d'autres composés de petit poids moléculaire sont réabsorbés par des transports actifs : glucose, acides aminés, ions.
- **Sécrétion** : les nombreuses molécules, devant être excrétées, sont déversées dans l'urine par des transports actifs : protons, acide urique, créatinine. L'urée synthétisée dans le foie est la forme d'excrétion des protéines et des acides aminés. Sa concentration reflète directement le métabolisme des protéines : 70 g de protéines conduisent à la formation d'environ 30 g d'urée (chez l'homme). L'acide urique est le produit terminal du métabolisme des purines et la créatinine provient du métabolisme musculaire. Des dérivés d'acides aminés libres (hippurate) et des acides aminés modifiés (hydroxyproline) apparaissent également dans les urines. Parmi les autres composants de l'urine, on note des conjugués de l'acide sulfurique, la glycine et d'autres composés polaires formés dans le foie par biotransformation. On retrouve les métabolites de plusieurs hormones (catécholamines, stéroïdes, sérotonine). Il y a aussi des hormones protéiques comme la gonadotropine chorionique (36 kDa), de petit poids moléculaire, libérée dans le sang au début de la grossesse et présente en très large quantité (test immunologique de grossesse basé sur sa détection).

Pour le cheval sain, il est important de noter que l'urine est une matrice sursaturée en sels et qu'il est commun d'y observer des urolithiases, c'est-à-dire des calculs (Mair et Osborn, 1990). Les cristaux sont de plusieurs natures dont les principaux sont présentés dans le Tableau I-9. L'urine normale de cheval est en situation d'équilibre entre la formation et la dissolution des cristaux (Deleuze et Hanzen, 2001).

3. MÉTHODES DE DÉTECTION DE L'HORMONE DE CROISSANCE

3.1. Méthodes analytiques indirectes

Les méthodes analytiques indirectes de détection de l'hormone de croissance sont basées sur l'utilisation de systèmes biologiques reconnaissant la structure tridimensionnelle de l'hormone de croissance. Cette reconnaissance de la GH dans le milieu à analyser peut être effectuée soit par un récepteur cellulaire spécifique de la GH (bio-essais) ou par des anticorps spécifiques de la GH (méthodes immunologiques). Dans les deux cas, c'est l'interaction de la GH avec son récepteur spécifique qui sera mesurée.

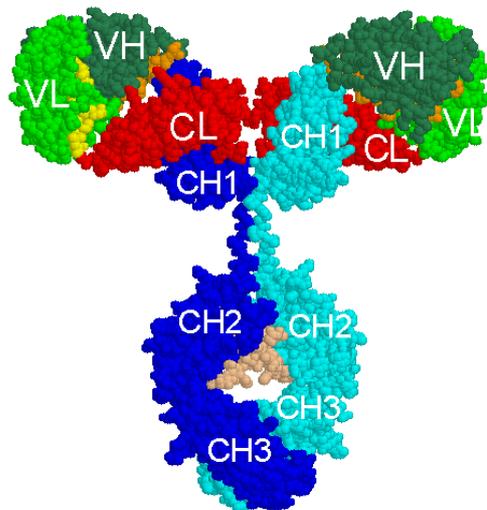


Figure I-15 : modélisation moléculaire d'une IgG1 humaine

(<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/padlan.htm>)

3.1.1. Les bio-essais

Les « bio-essais » sont des méthodes permettant de mesurer la présence de la molécule par son activité intrinsèque c'est-à-dire l'effet qu'elle va générer lors de sa fixation sur son récepteur spécifique. De nombreux « bio-essais » concernant la GH ont été publiés tant *in vivo* qu'*in vitro* (Tableau I-10). Historiquement, deux dosages biologiques *in vivo* ont été les plus utilisés. Le premier consiste à mesurer les gains de poids de rats hypophysectomisés (Marx *et al.*, 1942). Le second est le test du tibia qui consiste en la mesure de l'augmentation de l'épaisseur du cartilage de conjugaison de l'épiphyse proximale du tibia du rat hypophysectomisé suite à une exposition à la GH (Greespan *et al.*, 1949). Néanmoins, la précision de réponse de ces deux tests associée à l'influence du stress et autres facteurs environnementaux ne permettent pas de déterminer des concentrations de GH plasmatiques fiables (Ishikawa *et al.*, 2000). C'est pour cette raison que différents auteurs ont travaillé sur des « bio-essais » *in vitro*. Il existe deux techniques principales : la première est basée sur la réponse de lignées cellulaires immortelles, en particulier les cellules Nb2 d'un lymphome murin où la réponse enregistrée se mesure par l'augmentation d'activité prolifératrice des cellules (Tableau I-10). La seconde, basée sur les cellules fibroblastiques de souris, 3T3-F442A où la réponse est une mesure de l'augmentation de la transformation des cellules fibroblastiques vers le phénotype adipocytaire (Brook et Marshall, 1998).

3.1.2. Les méthodes immunologiques

3.1.2.1. La notion d'anticorps

Les anticorps sont des protéines spécialement chargées de reconnaître des antigènes (protéiques ou non) afin de les neutraliser. Ce sont des protéines plasmatiques migrant, à l'électrophorèse standardisée au niveau de la fraction γ , d'où leur nom de γ -globulines, appelées aussi immunoglobulines (Ig). La variété de γ -globulines la plus abondante est l'IgG. Il existe d'autres variétés comme IgA, IgM, IgD et IgE. La structure élémentaire de toutes les immunoglobulines G comporte 2 chaînes lourdes (H : heavy) de 50 000 Da, identiques entre elles, et deux chaînes légères (L : light) de 22 000 Da, également identiques entre elles, réunies par des ponts disulfures. La structure définie par diffraction des rayons X puis modélisée (Figure I-15) permet de comprendre l'enchevêtrement complexe des chaînes lourdes et légères entre elles. Les parties variables de ces chaînes sont notées « V » et les parties constantes « C ».

Une zone spécifique d'un anticorps est appelée domaine. A titre d'exemple, on parlera donc de domaine variable de la chaîne lourde (VH).

Pour obtenir des anticorps spécifiques de bonne qualité, l'investissement en temps et en argent est assez considérable. Suivant les moyens à disposition ainsi que du but recherché, il est possible de travailler avec plusieurs types d'anticorps :

- **anticorps polyclonaux** : ce type d'anticorps est obtenu en immunisant le plus souvent des lapins à plus ou moins long terme selon le degré d'immunogénéité de l'antigène. Régulièrement, pendant le protocole d'immunisation, un suivi des quantités d'anticorps présents dans le plasma de l'animal est réalisé (Dot-Blot). Lorsque les quantités désirées sont atteintes, l'animal est sacrifié pour obtenir tout son plasma. Ensuite, des méthodes plus ou moins drastiques de purification des anticorps sont appliquées afin d'atteindre le degré de pureté désiré (Male, 1999). Les anticorps polyclonaux **reconnaissent différents épitopes de la molécule immunogène**.

- **anticorps monoclonaux** : ce sont des anticorps homogènes produits par un seul clone de cellule. Ils sont normalement produits par des hybridomes, c'est-à-dire préparés en fusionnant des cellules spléniques de souris ou rat immunisés contre l'antigène avec un myélome non sécrétant. Une fois les hybridomes isolés, les surnageants de culture sont analysés par une technique adéquate et ceux produisant l'anticorps attendu sont clonés (Male, 1999). Les anticorps monoclonaux reconnaissent spécifiquement **un seul épitope de la molécule immunogène**.

- **anticorps recombinants** ou anticorps produits par des phages. Cette méthode utilise les techniques de biologie moléculaire pour permettre d'obtenir des anticorps monoclonaux ou des fragments d'anticorps. Des ARNm codant pour les domaines V_H (région variable de la chaîne lourde) et V_L (région variable de la chaîne légère) sont amplifiés et reliés par un « écarteur » (spacer) pour produire un gène codant pour un fragment F_V (ne contenant qu'un site anticorps). Le gène synthétique est alors inséré dans un vecteur (phage), qui exprimera F_V sur son enveloppe, c'est-à-dire à sa surface. Les phages sont alors sélectionnés en fonction de leur capacité à se lier à des plaques recouvertes d'antigène, et les phages positifs sont utilisés pour transfecter des bactéries qui pourront alors synthétiser les fragments F_V en quantité importante en fermenteur (Male, 1999).

Tableau I-11 : méthodes immunologiques de mesure de la GH dans différentes matrices biologiques rapportées dans la littérature pour le cheval, l'homme, le porc et le bovin

GH	Matrice	Population	Dosage	Auteurs
eGH	Plasma	cheval	RIA	(Thompson Jr <i>et al.</i> , 1992)
	Plasma	Poulain	RIA	(Stewart <i>et al.</i> , 1993)
	Plasma	Juments Étalons hongres	RIA	(Thompson Jr <i>et al.</i> , 1994)
	Plasma	Cheval	RIA	(Cahill <i>et al.</i> , 1994)
	Plasma	Cheval	RIA	(Christensen <i>et al.</i> , 1997)
	Plasma	Cheval	RIA	(Kennedy <i>et al.</i> , 2002)
	Sérum	Cheval	RIA	(Dart <i>et al.</i> , 2003)
	Plasma	Cheval	ELISA	(Borromeo <i>et al.</i> , 2005)
	Plasma	Cheval	ELISA	(Borromeo <i>et al.</i> , 2007)
	hGH	Plasma	Homme	(ELISA)
Plasma		Homme	ELISA	(De Palo <i>et al.</i> , 2001)
pGH	Plasma	Porc	ELISA	(Secchi <i>et al.</i> , 1999)
	Plasma	Bovin	ELISA	(Secchi <i>et al.</i> , 1988)
	Lait	Bovin	RIA	(Schams <i>et al.</i> , 1988)
bGH	Plasma	Bovin	ELISA	(Castigliengo <i>et al.</i> , 2006)
	Plasma	Bovin	ELISA	(Cisse <i>et al.</i> , 1991)
	Plasma	Bovin	ELISA	(de Boer <i>et al.</i> , 1991)

Si l'on compare aux sérums polyclonaux, les anticorps monoclonaux et recombinants, ces derniers sont mieux définis, mais pas nécessairement plus spécifiques ou d'affinité plus élevée mais les quantités obtenues sont théoriquement illimitées grâce à la conservation par congélation des lignés cellulaires ou phagiques d'intérêt.

3.1.2.2. Méthodes immunoenzymatiques et radioimmunologiques

3.1.2.2.1. Principes

Les méthodes de dosage immunologique sont basées sur la détection spécifique d'un épitope immunologique d'une molécule que l'on cherche à mettre en évidence ou à doser. Ces méthodes sont principalement de type radioimmunologique (RIA : RadioImmunoAssay) ou immunoenzymatique (ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Le mode opératoire principal de ces méthodes est identique et correspond à une adsorption passive ou à une fixation covalente sur une phase solide (plaque 96 puits) d'un anticorps spécifique qui sera exposé à un mélange contenant l'antigène à doser dans l'échantillon (non marqué) et l'antigène marqué (concentration connue). Les molécules d'antigène marqué et non marqué entrent en compétition pour les sites de liaison de l'anticorps. La quantité d'antigène marqué qui se fixe est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène présent dans l'échantillon à doser. Des courbes d'étalonnages sont réalisées à l'aide de quantités connues d'antigène non marqué. Ce type de dosage par compétition utilise un marquage enzymatique dans le cas de l'ELISA ou un marquage radio-isotopique pour le dosage par RIA (Male, 1999).

3.1.2.2.2. Application au dosage de la GH

De nombreuses méthodes ont ainsi été développées pour détecter des hormones, protéiques ou non, dans les fluides biologiques. L'hormone de croissance fait partie de ce panel de molécules détectées par ses techniques immunologiques dont les principales sont présentées dans le Tableau I-11. La sensibilité de détection de la GH par ces tests peut atteindre 0,5 à 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour les plus performants.

Les exemples les plus encourageants de haute spécificité des tests ELISA sont ceux réalisés par Aston (Aston *et al.*, 1985) avec des anticorps monoclonaux « Mab » capables de distinguer une hormone de croissance humaine (hGH) d'une recombinante (met-hGH) ou dernièrement par Castigliero (Castigliero *et al.*, 2006) avec des anticorps monoclonaux potentiellement capables de différencier la bGH de la rbGH (Hilac[®]). Toutefois ces auteurs mais ont avoué avoir eu des difficultés pour atteindre leurs objectifs.

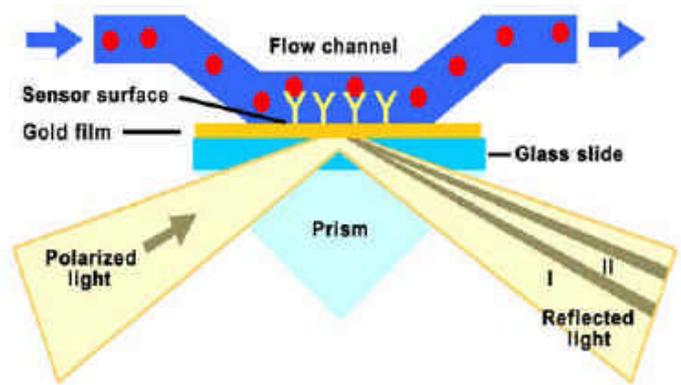


Figure I-16 : principe physique de la Résonance Plasmonique de Surface

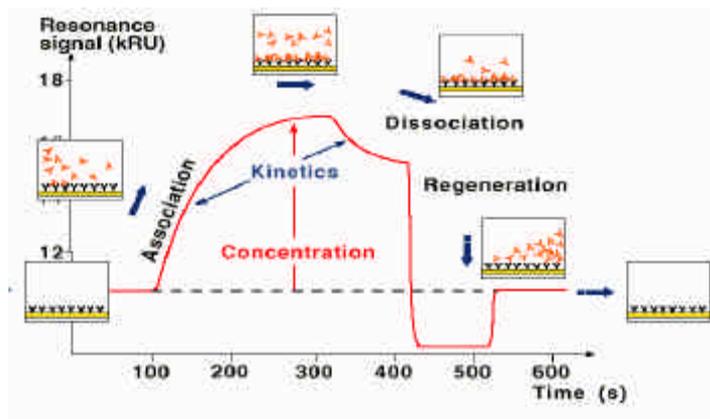


Figure I-17 : interprétation d'un sensorgramme en fonction des différentes étapes de l'interaction récepteur-ligand

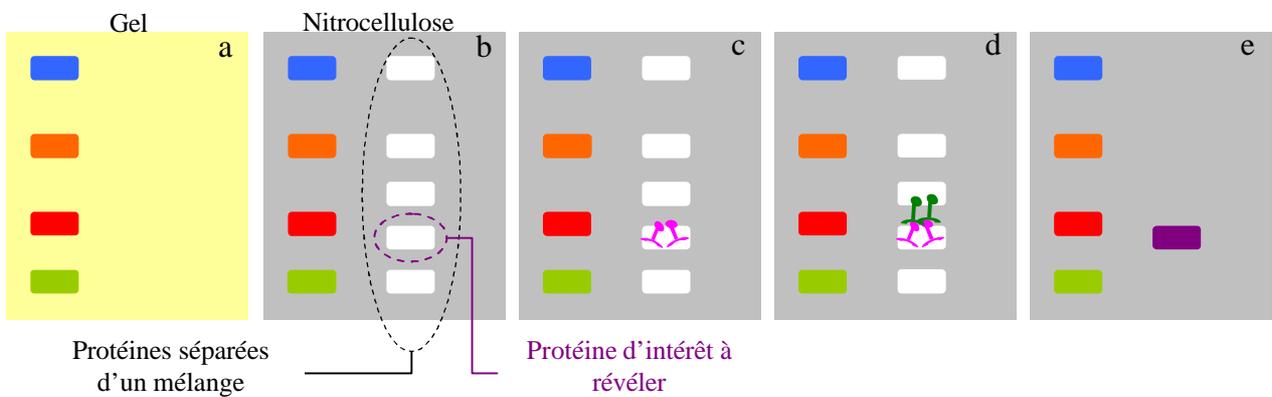


Figure I-18 : principe du Western-Blot

3.1.2.3. Technologie de Résonance Plasmonique de Surface

La résonance plasmonique de surface (RPS) est une méthode de mesure de la liaison d'un « ligand » sur un « récepteur » adsorbé à la surface d'une couche métallique (Figure I-16). Le système de détection est basé sur une variation de l'indice de réflexion de l'interface quand le ligand se fixe aux récepteurs. Le plasmon de surface est une onde à décroissance exponentielle des deux côtés de l'interface séparant un métal (or, argent...) d'un milieu diélectrique sans pertes (milieu biologique), parallèlement à laquelle elle se propage.

L'onde plasmon joue le rôle de sonde dans le milieu où se situe la réaction d'interaction biomoléculaire. L'information de cette interaction pourra alors être recueillie soit sur la phase soit sur l'amplitude du faisceau réfléchi. Généralement, l'onde incidente polarisée traverse d'abord un prisme de verre d'indice de réfraction élevé et se réfléchit sur l'interface recouverte de métal sous un angle d'incidence supérieur à l'angle critique défini par rapport au milieu biologique. Ce prisme constitue le dispositif de couplage de l'onde incidente avec l'onde de surface (plasmon de surface). Cette technologie est parfaitement adaptée à l'hormone de croissance.

En fonction des objectifs à atteindre, il est possible de greffer la GH sur le canal pour détecter la présence d'anticorps dans l'échantillon ou bien de greffer un anticorps spécifique de l'hormone de croissance pour chercher à détecter l'hormone elle-même en milieu biologique. La forte sensibilité de la réponse optique permet d'obtenir un « sensorgramme » correspondant aux différentes étapes de l'interaction « récepteur-ligand ». La Figure I-17 représente un signal expérimental typique avec une phase d'association ligand-récepteur, de dissociation et de régénération de la puce.

Dernièrement, avec la technologie de SPR-BIA (Surface Plasmon Resonance-Biosensor ImmunoAssay) le dépistage d'hormones de croissance dans des seringues suspectées d'être utilisées frauduleusement chez les bovins a été réalisé avec succès (Heutmekers *et al.*, 2007).

3.1.2.4. Western-Blot

A l'issue d'une électrophorèse 1D ou 2D, les protéines présentes dans le gel ne sont pas colorées mais sont transférées sur une membrane de nitrocellulose au moyen d'un courant électrique (Kurien et Scofield, 2006) Figure I-18 (a). Grâce à l'utilisation de marqueurs de poids moléculaires colorés, la qualité de la migration peut être appréciée. La nitrocellulose est ensuite bloquée (b) c'est-à-dire que les réactions d'interactions non spécifiques avec la membrane sont limitées.

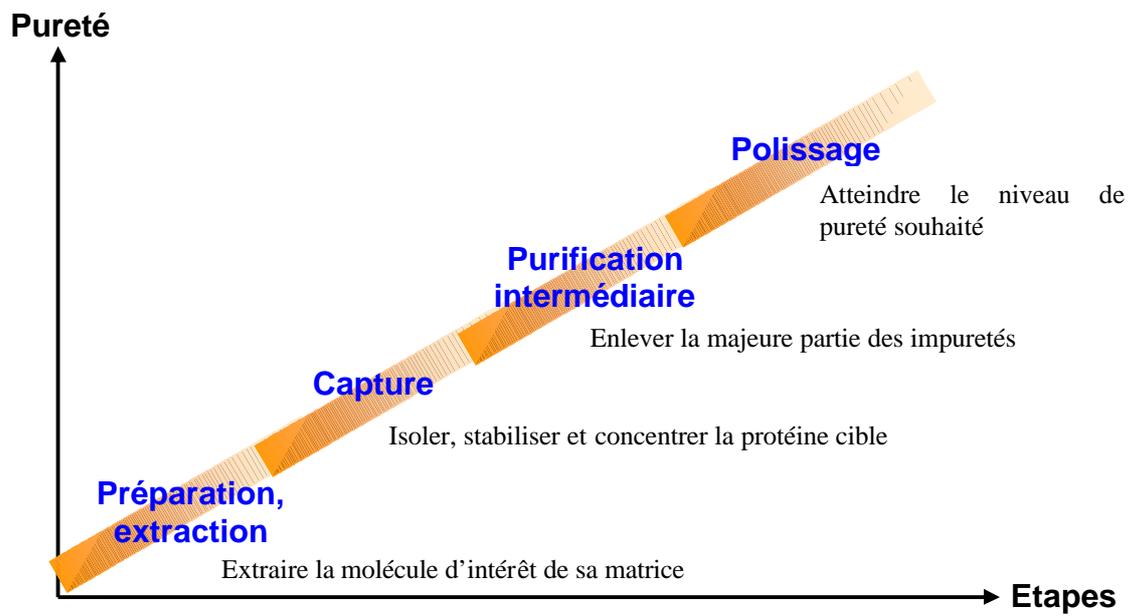


Figure I-19 : schéma des phases d'une stratégie de purification

Ensuite toute la surface de la membrane est mise au contact de l'anticorps pour permettre de reconnaître la molécule à mettre en évidence (c). Un anticorps secondaire marqué spécifique du premier est ajouté (d). La révélation de l'interaction entre les deux IgG est effectuée en ajoutant le substrat de l'enzyme (e). Entre chacune de ces étapes, des lavages sont réalisés. Le Western-Blot est un outil qui a été utilisé pour détecter la présence d'anticorps spécifiques anti-rbGH en milieu complexe à partir de bovins traités et ce, jusqu'à 28 jours (Pinel *et al.*, 2005).

3.2. Méthodes analytiques directes

Les méthodes analytiques indirectes ne permettant pas de discriminer les formes endogènes des formes recombinantes de l'hormone de croissance, des stratégies de purification ont été élaborées afin d'extraire la GH des échantillons pour l'analyser spécifiquement. En effet, pour envisager la détection directe et spécifique d'une administration de rGH dans des matrices biologiques d'animaux traités, il est nécessaire de purifier les hormones de croissance avec une méthode adaptée afin de définir par une analyse qualitative leur composition en acides aminés en utilisant une technique de spectrométrie de masse et ainsi différencier GH et rGH dont la séquence en acides aminés diffère (Van Dorsselaer *et al.*, 1990 ; Pinel *et al.*, 2004).

3.2.1. Méthodes de purification des protéines

Pour obtenir une méthode efficace de purification d'une protéine d'intérêt, il faut réussir à la séparer du mélange protéique dans lequel elle se trouve, en s'appuyant sur ses propriétés physico-chimiques intrinsèques, essentiellement définies par sa composition en acides aminés mais aussi par sa structure tridimensionnelle. Ces propriétés sont plus précisément liées à la taille et/ou la conformation de la protéine, à sa charge et la distribution des charges en surface à un pH donné, à sa polarité et la distribution des résidus hydrophiles/hydrophobes en surface et à sa solubilité dans l'eau ou les solvants organiques. La protéine d'intérêt devant être purifiée à partir de matrices biologiques complexes, la plupart des protocoles de purification requièrent plus d'une étape pour aboutir au niveau de pureté désiré. À chaque étape une perte de produit est observée, par conséquent, le nombre d'étapes doit être minimal pour atteindre les objectifs de rendement souhaités. Généralement, la stratégie de purification d'une protéine nécessite trois phases bien distinctes après une pré-purification de l'échantillon (Figure I-19) parmi lesquelles : la phase de capture, permettant d'isoler, stabiliser et concentrer la protéine cible ; la phase de purification intermédiaire pour éliminer la majeure partie des impuretés et la phase de « polissage » pour atteindre le niveau de pureté souhaité.

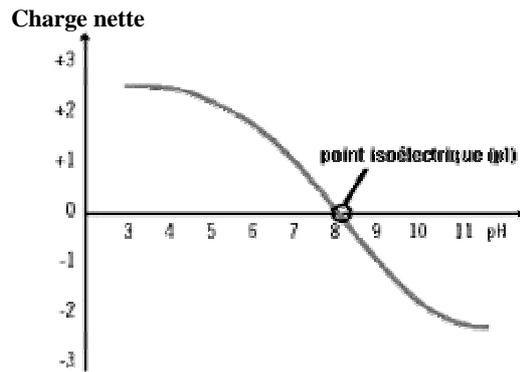


Figure I-20 : représentation de l'évolution de la charge nette d'une protéine en fonction du pH

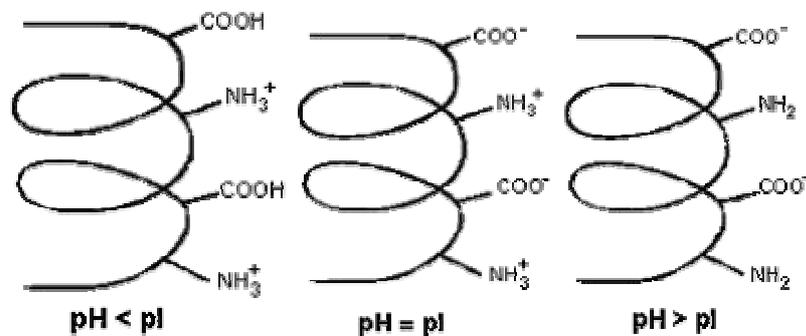


Figure I-21 : représentation schématique de la modification des groupements ionisables en fonction du pH

Tableau I-12 : étapes de purification utilisant le sulfate d'ammonium

Méthode	pH	% saturation	Matrice	GH	Auteurs
Sulfate d'ammonium	6,6	50	Hypophyses de bovins	bGH	(Ellis <i>et al.</i> , 1954)
	5,5	50	Hypophyses de bovins	bGH	(Kwa <i>et al.</i> , 1965)
	7	étapes à 1,2 M	Hypophyses de porcs	pGH	(Chen <i>et al.</i> , 1970)
	7,2	20	Hypophyses de chevaux	eGH	(Conde <i>et al.</i> , 1973)
	7,2	45	Hypophyses de bovins	bGH	(Spitsberg, 1987)
	7	50	Extraits <i>Escherichia. coli</i>	hGH	(de Oliveira <i>et al.</i> , 1999)
	7,4	45	Extraits <i>Pichia pastoris</i>	rpGH	(Ouyang <i>et al.</i> , 2003)

3.2.1.1. Méthodes de précipitation

Ces méthodes utilisent la solubilité différentielle des protéines. Comme chaque protéine est plus ou moins soluble en solution (fonction de sa composition propre en acides aminés), il est possible d'en séparer plusieurs d'un mélange en fonction de leur tendance à précipiter plus ou moins rapidement quand change la force ionique de la solution qui les contient. Les solutions de protéines ne doivent pas être considérées comme de véritables solutions mais plutôt comme des dispersions colloïdales stabilisées par des forces électrostatiques d'interaction ou d'exclusion avec le solvant. La déstabilisation ou précipitation consiste alors à neutraliser ces forces stabilisatrices. La solution de précipitation entre en compétition avec les protéines pour les molécules d'eau disponibles en solution.

3.2.1.1.1. Précipitation au sulfate d'ammonium

Le sulfate d'ammonium est le sel le plus couramment utilisé pour précipiter des protéines car il possède 3 avantages majeurs (Scopes, 1981). Tout d'abord, à saturation, il est à une molarité suffisante pour induire la précipitation de la plupart des protéines, ensuite, il ne produit pas une chaleur excessive lors de sa dissolution, ce qui permet à la chaleur générée d'être facilement dissipée. Enfin, il protège la plupart des protéines de la dénaturation. Propriété mise à profit dans la conservation des protéines purifiées en solution saturée de sulfate d'ammonium (Scopes, 1981).

Les protéines ayant leur minimum de solubilité à leur point isoélectrique, il est intéressant de connaître la composition en acides aminés de la molécule à purifier pour déterminer le nombre et la nature de ses groupements ionisables. Grâce aux groupements ionisables, les protéines peuvent avoir à un pH donné une charge nette positive ou négative (Figure I-20 et Figure I-21) ce qui permet dans des conditions physico-chimiques définies de pouvoir discriminer les protéines présentes dans un mélange, c'est-à-dire de les faire précipiter sélectivement à leur point isoélectrique (pI). Quand la concentration en sel est assez élevée pour priver les protéines des molécules d'eau qui l'hydratent, celles-ci précipitent, c'est l'effet de « salting-out ».

La principale méthode biochimique d'extraction de la GH utilise le sulfate d'ammonium (Tableau I-12). Cette méthode a été largement utilisée pour purifier à moindre coût l'hormone de croissance des cellules hypophysaires ou bien les hormones de croissance recombinantes lors de leur processus de fabrication.

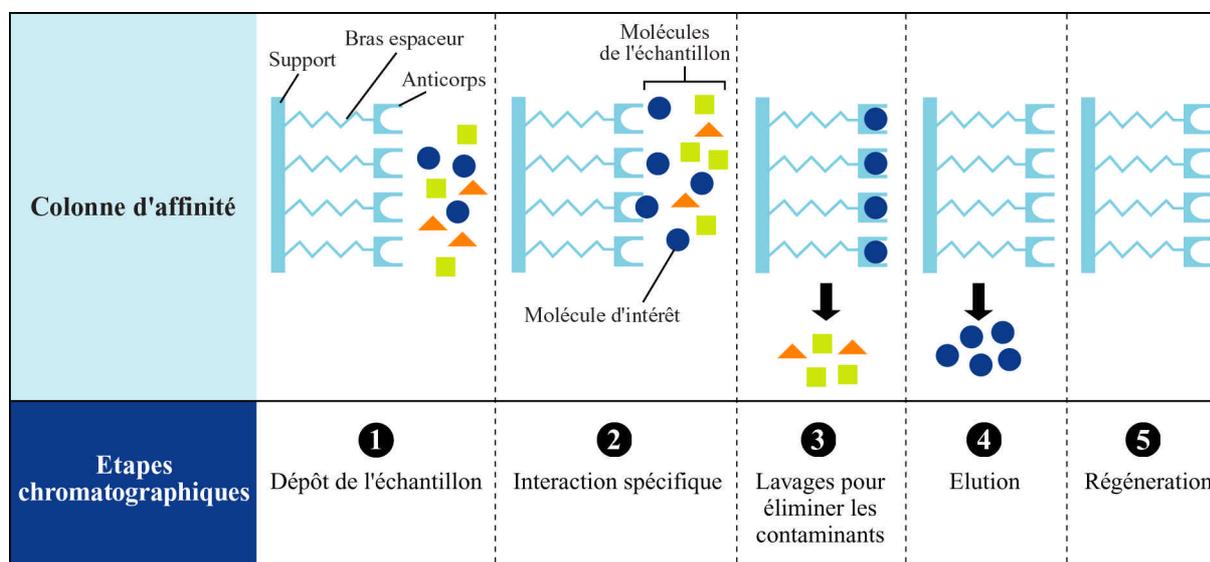


Figure I-22 : principe de la chromatographie d'immunoaffinité

Tableau I-13 : conditions d'(immuno)affinité appliquées à la purification des GH

Méthodes	Ac et Colonnes	Application	Matrice	élution	GH	Auteurs
IAC	monoclonaux anti-bPrl	Fondamentale	hypophyses	100 mM Glycine, pH 2,8	[bPrl]	(Kim et Brooks, 1993)
	monoclonaux anti-bGH	Fondamentale	hypophyses	50 mM Glycine, pH 2,5	bGH	(Secchi et Borromeo, 1997)
	polyclonaux anti-pGH	Méthode de contrôle limite 10 µg.L ⁻¹	Sérum bovin	70:30 éthanol:eau	rpGH	(Blokland <i>et al.</i> , 2003)
	monoclonaux anti-cGH	Fondamentale	Étape de purification	50 mM Glycine, 150 mM NaCl, pH 3	cGH	(Berumen <i>et al.</i> , 2004)
IMAC	IMAC (Ga ³⁺)	Phosphopeptides	hypophyses	200 mM phosphate de sodium pH 8,4	hGH	(Giorgianni <i>et al.</i> , 2004)
	IMAC (Ga ³⁺)	Phosphopeptides	hypophyses	Selon le kit Pierce	hGH	(Zhan <i>et al.</i> , 2005)
Lectine	Concanavalin A	glycoprotéines	hypophyses	100 mM α-D-méthylmannose	cGH	(Berumen <i>et al.</i> , 2004)

Au regard des résultats présentés Tableau I-12, il apparaît que les hormones de croissance précipitent à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium à un pH voisin de 7.

3.2.1.1.2. Précipitation par les solvants organiques

Les solvants organiques comme l'acétone et l'éthanol ont des effets similaires à ceux observés pour des fortes concentrations en sel, quand ils sont ajoutés à une solution protéique en diminuant la solubilité des protéines dissoutes (Hames, 1981). Différentes études rapportent des exemples de précipitation de l'hormone de croissance à l'éthanol (Ellis *et al.*, 1954 ; Dellacha et Sonenberg, 1964) ou à l'acétone (Saxena et Henneman, 1966 ; Giorgianni *et al.*, 2004) à froid (-20°C).

3.2.1.1.3. Précipitation par les acides organiques

En milieu légèrement acide, l'addition d'acides gras à chaînes courtes, tel que l'acide octanoïque (caprylique), provoque la précipitation de la plupart des protéines contenues dans un sérum, à l'exception des IgG (Steinbuch et Audran, 1969). La combinaison de cette technique avec d'autres méthodes de purification, par exemple l'utilisation d'une colonne d'échange d'ions, de protéine A ou G ou la précipitation au sulfate d'ammonium, permet d'obtenir une solution d'anticorps relativement pure.

3.2.1.2. Méthodes chromatographiques

3.2.1.2.1. Chromatographie basse pression

Le Tableau I-13 et le Tableau I-14 présentent les principales méthodes d'isolement de la GH citée dans la littérature, en précisant les conditions physico-chimiques particulières élaborées par chacun des auteurs. La GH isolée par ces méthodes biochimiques est généralement présente en grande quantité car elle provient principalement d'extraits d'hypophyses d'animaux ou de l'extraction de microorganismes en vue d'obtenir une hormone de croissance recombinante.

3.2.1.2.1.1. Chromatographie d'affinité

Le principe de cette technique repose sur l'interaction spécifique anticorps-ligand dans le cas de la chromatographie d'immunoaffinité (IAC) (Figure I-22) ou sur une interaction spécifique de type récepteur-ligand lorsque d'autres molécules que les anticorps sont utilisés (Delaunay *et al.*, 2000). Dans le cas de l'immunoaffinité, après avoir déposé sur la colonne la solution à analyser contenant la protéine à purifier (1), les anticorps spécifiques se lient à l'antigène (2).

Tableau I-14 : méthodes chromatographiques recensées pour isoler la GH d'un milieu complexe

Méthodes	Colonnes	Conditions de séparation	GH	Auteurs
Échangeur d'anions	DEAE	10 mM borate de sodium ; jusqu'à 40 mM NaCl	bGH	(Kwa <i>et al.</i> , 1965)
	Q sepharose	50 mM Tris-HCl pH 8 ; élution par gradient de NaCl de 0 à 300 mM	rhGH	(Becker et Hsiung, 1986)
	DEAE	100 mM NH ₄ HCO ₃ , pH 8	bGH	(Spitsberg, 1987)
	MonoQ	Gradient : 30% ACN / 50 mM Tris-HCl jusqu'à 30% ACN / 50 mM Tris-HCl / 0,3 M NaCl	hGH	(Riggin <i>et al.</i> , 1987)
	DEAE	12 mM Bis-Tris pH 7,5 ; gradient linéaire jusqu'à 250 mM NaCl	hGH	(Haro <i>et al.</i> , 1998)
	DEAE	10 mM ammonium acétate pH 8, 50 mM NaCl, gradient linéaire jusqu'à 200 mM NaCl	hGH	(de Oliveira <i>et al.</i> , 1999)
	Q sepharose	10 mM ammonium acétate pH 7, 50 mM NaCl	hGH	(de Oliveira <i>et al.</i> , 1999)
	Q sepharose	10 mM Tris-HCl ; 1 mM EDTA pH 8,5 – élution par 5 volumes de phase avec 0,1 M NaCl	pGH	(Ouyang <i>et al.</i> , 2003)
Exclusion stérique	Sephadex G200, G100, G75, G50	50 mM borate-KCl, pH 8,6	eGH	(Saxena et Henneman, 1966)
	Sephadex G100	0,1 M glycine-HCl, pH 3,6	eGH	(Conde <i>et al.</i> , 1973)
	Sephadex G75	10 mM ammonium acétate pH 5,5	bGH	(Spitsberg, 1987)
	TSK G3000 SW	20 mM borate de sodium ; 1,4 mM EDTA ; pH 7,3	rbGH	(Chang <i>et al.</i> , 1996)
Ultrafiltration	Amicon 10 kDa	1 % tampon bicarbonate d'ammonium	hGH	(Karlsson <i>et al.</i> , 1999)
	Vivaspin 30 kDa, 10 kDa	Plasma 1g d'urée ; 6000g 30 min	rpGH	(Blokland <i>et al.</i> , 2003)
Interaction hydrophobe	Phenyl CL4B	Gradient linéaire d'acétonitrile (0-30%) et d'acétate d'ammonium pH 8,5 de 100 à 10 mM	eGH	(Cahill <i>et al.</i> , 1994)
		Lavages avec 200 mM ammonium acétate pH 7, 50 mM ammonium acétate pH 7 ; élution par 0,3 mM phosphate de sodium pH 7	hGH	(de Oliveira <i>et al.</i> , 1999)

Une ou plusieurs étapes de lavage sont réalisées afin d'éliminer tous les contaminants (3), l'élution peut être réalisée par un changement de force ionique, un tampon de pH élevé ou faible contenant des agents dénaturants pour faciliter la dissociation de la liaison protéine-ligand (4). Enfin, une étape de régénération de la colonne est souvent nécessaire (5).

Les chromatographies d'immunoaffinité réalisées avec des anticorps polyclonaux ou monoclonaux ainsi que les chromatographies d'affinité utilisant une lectine ou un métal (IMAC : immobilized-metal affinity metal chromatography) ont été employées avec succès pour purifier à partir d'hypophyses des hormones de croissance. Le Tableau I-13 présente quelques résultats obtenus à partir de ces techniques. Il semble que l'utilisation d'anticorps monoclonaux facilite l'élution des hormones de croissance en utilisant entre 50 et 100 mM de Glycine, une force ionique adaptée et un pH proche de 3. Les résultats des conditions d'élution obtenues par Blockland (Blockland *et al.*, 2003), seule méthode publiée à ce jour pour détecter un ajout de rpGH dans du sérum de bovin (PE : 10 mL) à une concentration de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$, indiquent que l'élution avec des anticorps polyclonaux est complexe et nécessite une assez longue mise au point.

3.2.1.2.1.2. Chromatographie d'échange d'ions

Le principe de cette chromatographie est basé principalement sur les différences d'ionisation des acides aminés présents à la surface de la protéine. Les acides aminés basiques (lysine, arginine) sont généralement chargés positivement tandis que les acides aminés acides (acide aspartique et glutamique) ont une charge négative à pH neutre (Bollag *et al.*, 1996). Ainsi, à un pH donné, la protéine possède une charge nette nulle (Figure I-21). Pour une protéine donnée devant être purifiée, il est donc possible de travailler plus particulièrement avec un échangeur d'anions (résine positive) ou de cations (résine négative). Cette technique a été appliquée à la purification de la GH et il a été rapporté exclusivement l'utilisation d'échangeurs d'anions (Q sepharose, DEAE), Tableau I-14.

3.2.1.2.1.3. Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique, sépare les protéines selon leur volume hydrodynamique (rayon de Stokes). Les pores de la phase présentent une taille définie qui permet au tampon et aux petites molécules d'y pénétrer. Les protéines de taille plus élevées sont alors « exclues » du gel et sont éluées les premières (Bollag *et al.*, 1996). Pour des besoins de fractionnement des échantillons contenant la GH, l'exclusion stérique a été utilisée à différents seuils de coupure (Tableau I-14).

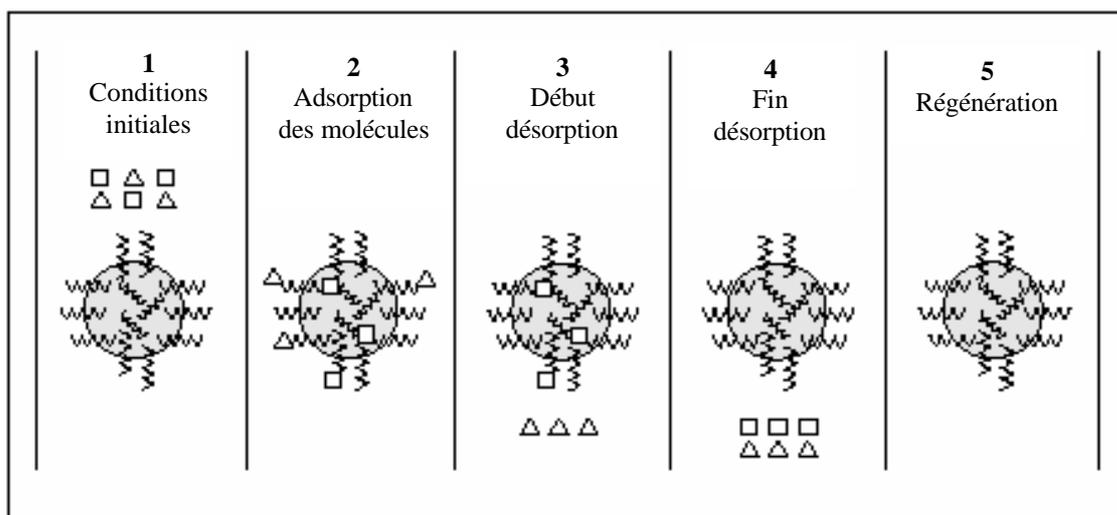


Figure I-23 : principe de la chromatographie en phase inverse avec une élution par gradient

Tableau I-15 : Caractéristiques des phases les plus utilisées en analyse des protéines/peptides :

Phases :	Caractéristiques :	Application :
C ₄	Rétention hydrophobe faible.	Grosses protéines, gros polypeptides (MW>5000), peptides très hydrophobes, chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC).
C ₈	Rétention hydrophobe moyenne.	Protéines et peptides de taille moyenne, échantillons exposants des propriétés hydrophiles.
C ₁₈	Rétention hydrophobe élevée.	Petits peptides hydrophiles, application au peptide mapping, échantillon de protéines/peptides (MW<15000)

3.2.1.2.2. Chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC)

La séparation d'un mélange de peptides ou de protéines par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) est liée à la capacité de rétention des molécules contenues dans l'échantillon, c'est-à-dire à son pouvoir d'interaction avec la phase stationnaire (Figure I-23). Spécifiquement, lorsque les molécules se déplacent au sein de la colonne, portées par une vitesse de débit contrôlée par une pompe, les composants individuels du mélange interagissent avec la phase mobile et la phase stationnaire avec plus ou moins d'importance provoquant ainsi leur séparation (Tableau I-15). Cette technique utilise des pressions assez élevées, des colonnes de microparticules qui minimisent les temps des cinétiques d'absorption et de désorption des molécules tout en permettant d'augmenter la vitesse de la phase mobile. Cette technique se prête bien à l'analyse d'échantillons ou à leur purification (préparative). Dans le cas d'une utilisation en phase inverse, la matrice est constituée de particules de silice portant des chaînes n-alkyl comme substituants. Généralement, une longueur de chaîne variant entre 4 et 18 atomes de carbone est utilisée. On parle alors de phase inverse car la matrice est moins polaire que la phase mobile ; cette dernière étant constituée le plus souvent d'eau et de solvants organiques (classiquement : méthanol, acétonitrile). L'élution s'effectue en augmentant le pourcentage de solvant organique dans la phase mobile ce qui diminue l'affinité de l'analyte pour la phase stationnaire. Pour les protéines et ceci afin d'éviter des phénomènes d'exclusion stérique, la porosité de la phase doit être de l'ordre de 300 à 500 Å.

Le Tableau I-16 présente les principales conditions HPLC recensées dans la littérature pour l'étude de la GH ou de ses peptides. Au travers de ce tableau récapitulatif, il apparaît que la séparation chromatographique au moyen d'un gradient d'ACN/H₂O 0,1% TFA est efficace à la fois pour la séparation d'hormones de croissance ou de leurs peptides issus de digestion enzymatique.

Tableau I-16 : tableau présentant les conditions de séparation en HPLC des hormones de croissance ou de leurs peptides

Analyses	Phases	Conditions de séparation	GH	Auteurs
Hormone entière	C ₄	50 mM Tris-HCl pH 7,5 - propanol	rhGH	(Riggin <i>et al.</i> , 1987)
	C ₄	Gradient ACN/H ₂ O 0,1% TFA	rhGH	(Teshima <i>et al.</i> , 1991)
	C ₄	Gradient ACN/H ₂ O 0,1% TFA	rhGH	(Oroszlan <i>et al.</i> , 1992)
	C ₁₈	Gradient ACN/H ₂ O 0,1% TFA	rbGH	(Chang <i>et al.</i> , 1996)
	C ₄	50 mM Tris-HCl pH 7,5 - propanol	rhGH	(de Oliveira <i>et al.</i> , 1999)
	C ₁₈	25 mM phosphate de potassium pH 6,5 - isopropanol	hGH	(Karlsson <i>et al.</i> , 1999)
	C ₁₈	Gradient ACN/H ₂ O 1% acide acétique	rpGH	(Blokland <i>et al.</i> , 2003)
Peptides	C ₁₈	Gradient ACN/H ₂ O 0,1% TFA	rhGH	(Becker et Hsiung, 1986)
	C ₁₈	Gradient ACN/H ₂ O 0,1% TFA	rhGH	(Teh <i>et al.</i> , 1987)
	C ₁₈	Gradient ACN/H ₂ O 0,1% TFA	rhGH	(Frenz <i>et al.</i> , 1990)
	C ₁₈	Gradient ACN/H ₂ O 0,05% TFA	rhGH	(Canova-Davis <i>et al.</i> , 1996)
	C ₈	Gradient (50% ACN)/H ₂ O 0,1% TFA	rbGH	(Chang <i>et al.</i> , 1997)
	C ₁₈	100 mM phosphate de sodium - acétonitrile	hGH	(Karlsson <i>et al.</i> , 1999)
	C ₁₈	Gradient ACN/H ₂ O 0,1% TFA	pGH, cGH eGH, rpGH	(Secchi <i>et al.</i> , 2001)
	Nano C ₁₈	Gradient ACN/H ₂ O 0,1% AF	hGH	(Giorgianni <i>et al.</i> , 2004)
	C ₈	Gradient ACN/H ₂ O 0,1% TFA	rhGH	(Jung <i>et al.</i> , 2005)
	Nano C ₁₈	Gradient ACN/H ₂ O 0,1% AF	rhGH	(Hepner <i>et al.</i> , 2005)
	C ₄	Gradient ACN/H ₂ O 0,5% acide acétique	rbGH	(Pinel <i>et al.</i> , 2004 ; Pinel <i>et al.</i> , 2005)
Nano C ₁₈	Gradient ACN/H ₂ O 0,1% AF	rbGH	(Heutmekers <i>et al.</i> , 2007)	

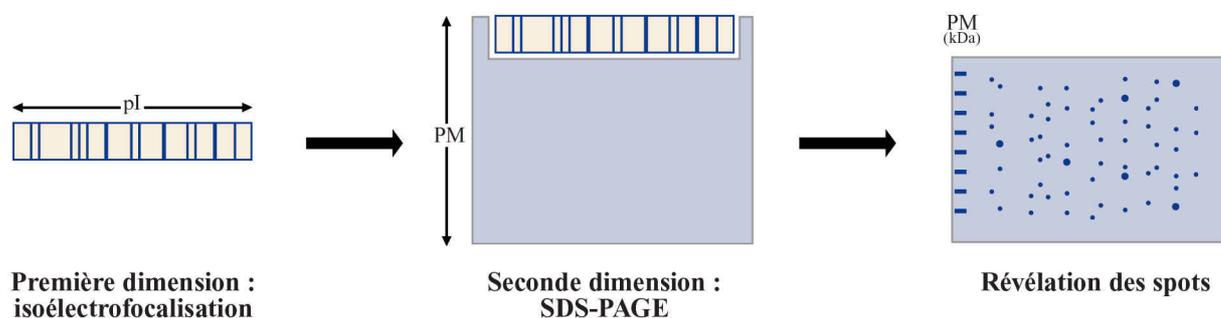


Figure I-24 : principe de l'électrophorèse bidimensionnelle

3.2.1.3. Méthodes électrophorétiques

3.2.1.3.1. *Électrophorèse monodimensionnelle (E1D)*

Au cours de l'électrophorèse en gel d'acrylamide, les protéines se déplacent dans un champ électrique. Normalement, la vitesse de migration des protéines dépend de trois facteurs : leur taille, leur forme et leur charge électrique. En milieu SDS (sodium dodecylsulfate ou laurylsulfate de sodium, détergent anionique), la migration d'une protéine ne dépend plus que de sa masse car le SDS confère des charges négatives à la molécule (Bollag *et al.*, 1996). L'électrophorèse monodimensionnelle a été très utilisée, notamment pour confirmer l'enrichissement en GH des extraits lors des étapes de purification (Becker et Hsiung, 1986 ; Spitsberg, 1987 ; Borromeo *et al.*, 1995 ; Secchi et Borromeo, 1997 ; Uchida *et al.*, 1997 ; Ouyang *et al.*, 2003) mais aussi pour caractériser des modifications structurales ayant une influence sur la mobilité électrophorétique de la GH (Haro *et al.*, 1996 ; Haro *et al.*, 1998 ; Berumen *et al.*, 2004 ; Grigorian *et al.*, 2005).

3.2.1.3.2. *Électrophorèse bidimensionnelle (E2D)*

Le principe fut décrit pour la première fois par O'Farrell en 1975 (O'Farrell, 1975) (Figure I-24, page suivante). Les protéines sont d'abord séparées selon leur point isoélectrique par isoélectrofocalisation (IEF), c'est-à-dire que pour une protéine donnée et pour une zone de pH donnée correspondant à son pI, cette protéine sera majoritairement sous forme zwitterion, soit avec une charge nette rigoureusement nulle l'empêchant ainsi de poursuivre tout déplacement électrophorétique. Les protéines sont une nouvelle fois séparées, mais cette fois-ci selon leur taille et leur forme par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE) avant d'être révélées par une des techniques de coloration disponible (Coomassie, nitrate d'argent...). L'électrophorèse bidimensionnelle a permis d'obtenir des informations importantes sur la masse molaire de la GH et de ses isoformes ainsi que des informations sur le point isoélectrique (pI) de ces molécules. De plus, L'E2D a contribué à la discrimination des isoformes de l'hGH dans l'hypophyse humaine par une approche protéomique (Beranova-Giorgianni et Desiderio, 2000 ; Zhan et Desiderio, 2003 ; Zhan *et al.*, 2005), à la mise en évidence de la non-conformité de lots de hGH Gentropin[®] (Hepner *et al.*, 2005) ainsi qu'à la détection de 1 µg.mL⁻¹ de rbGH ajouté dans le lait (Pinel *et al.*, 2005).

Tableau I-17 : conditions d'hydrolyse trypsique appliquée aux GH

Hydrolyse	GH	Enzyme	Qtt	pH	Conditions	Auteurs
solution	bGH	Trypsin-TPCK	-	8	37°C 2 h	(Seavey <i>et al.</i> , 1971)
	bGH	Trypsin-TPCK	1:50	9	37°C 4 h	(Graf et Li, 1974)
	eGH	Trypsin-TPCK	1:66	8	37°C 2 h	(Zakin <i>et al.</i> , 1976)
	rhGH	Trypsin-TPCK	1:25	8	37°C 6 h	(Becker et Hsiung, 1986)
	hGH	Trypsin-TPCK	1:100	8,3	37°C 2 h	(Johnson <i>et al.</i> , 1989)
	rhGH	Trypsin-TPCK	1:50	8,3	37°C 4 h	(Frenz <i>et al.</i> , 1990)
	rhGH	Trypsin-TPCK	1:25	8,2	37°C 4 h	(Teshima <i>et al.</i> , 1991)
	[bPrl]	Trypsin-TPCK	1:25	8	37°C 24 h	(Kim et Brooks, 1993)
	rhGH	Trypsin-TPCK	1:100	8	37°C 2 h	(Canova-Davis <i>et al.</i> , 1996)
	rbGH	Trypsin-TPCK	1:25	8,5	25°C 20 h	(Chang <i>et al.</i> , 1997)
	eGH, reGH	Trypsin seq. grade	1:30	8	22°C 20 h	(Bonnaire <i>et al.</i> , 1998)
	hGH, eGH, pGH, bGH	Trypsin-TPCK	1:25	7,9	25°C 24 h	(Laidler <i>et al.</i> , 1998)
	hGH	Trypsin seq. grade	1:70	8	37°C 4 h	(Karlsson <i>et al.</i> , 1999)
	bGH, pGH	Trypsin-TPCK	1:20	8,5	25°C 20 h	(Rochut <i>et al.</i> , 2000)
	pGH, cGH, eGH, rpGH	Trypsin seq. grade	1:25	8	37°C 15 h	(Secchi <i>et al.</i> , 2001)
	rbGH, bGH	Trypsin-TPCK	1:20	8	20°C 24 h	(Pinel <i>et al.</i> , 2004)
	hGH	Trypsin seq. grade	1:8,5	8	37°C 15 h	(Giorgianni <i>et al.</i> , 2004)
	rhGH	Trypsin seq. grade	1:300	7,5	37°C 4 h	(Jung <i>et al.</i> , 2005)
	rbGH	Trypsin-TPCK	1:50	8,5	22°C 15 h	(Heutmekers <i>et al.</i> , 2007)
	« in gel »	hGH	Trypsin seq. grade	100 ng.µL ⁻¹	8	37°C 20 h
rhGH		Trypsin seq. grade	40 ng.µL ⁻¹	8	30°C 4 h	(Hepner <i>et al.</i> , 2005)
rbGH		Trypsin seq. grade	250 ng.µL ⁻¹	8	22°C 15 h	(Pinel <i>et al.</i> , 2005)
hGH		Trypsin seq. grade	10 ng.µL ⁻¹	8	37°C 20 h	(Grigorian <i>et al.</i> , 2005)
hGH		Trypsin seq. grade	16 ng.µL ⁻¹	8	37°C 20 h	(Zhan <i>et al.</i> , 2005)

3.2.2. Conditions d'hydrolyse enzymatique appliquées aux GH

La digestion enzymatique d'une protéine a pour avantage de fournir des coupures spécifiques et répétables. Une analyse rigoureuse des peptides générés donne une information de séquence pour chacun d'entre eux et permet d'obtenir des informations précises de la protéine mère dont ils sont issus. Ce processus connu sous le nom de « peptide mapping » peut nécessiter l'utilisation de logiciels appropriés lorsqu'il faut travailler avec des centaines de peptides. Il est à différencier du « peptide mass fingerprint » qui consiste à saisir dans les banques de données protéiques les informations de masses de protéines inconnues afin de les identifier. L'étude de la littérature concernant l'hydrolyse enzymatique des hormones de croissance doit permettre de définir *a priori* les conditions optimales pour obtenir un peptide N-terminal caractéristique de la GH recombinante à mettre en évidence.

Pour des raisons fondamentales de connaissance des structures des hormones de croissance puis plus tard pour les discriminer entre elles, de nombreux auteurs ont eu recours à l'hydrolyse enzymatique pour fragmenter les protéines en peptides. Le Tableau I-17 présente les principales conditions d'hydrolyse enzymatique appliquées aux GH recensées dans la littérature.

Les auteurs utilisent généralement de la trypsine traitée avec du TPCCK (L-1-tosylamide-2-phenylethyl-chlorométhyl cétone) permettant d'éliminer l'activité chymotrypsine qui se produit lors de l'autolyse de l'enzyme (Keil-Dlouha *et al.*, 1971). Ils utilisent aussi de la trypsine de qualité « sequence grade » c'est à dire une enzyme de très haute pureté, traitée aussi TPCCK et qui, en plus, a subi une méthylation de ses lysines et arginines pour limiter davantage son autolyse. Il semble que le choix de la trypsine ce soit très vite imposé comme enzyme de choix pour ces études structurales de GH car elle génère statistiquement d'assez long peptides (15 à 20 acides aminés), tous potentiellement séparables en HPLC.

Les auteurs réalisent les hydrolyses enzymatiques à pH voisin de 8 avec des proportions, des temps et des températures d'incubation variables suivant la solution protéique de départ à digérer (standard ou mélange). Par ailleurs, il semble préférable de réaliser l'hydrolyse trypsique de GH pendant 15 à 20 heures à 37°C et de réaliser une mise au point préalable pour définir la quantité de trypsine à ajouter l'échantillon.

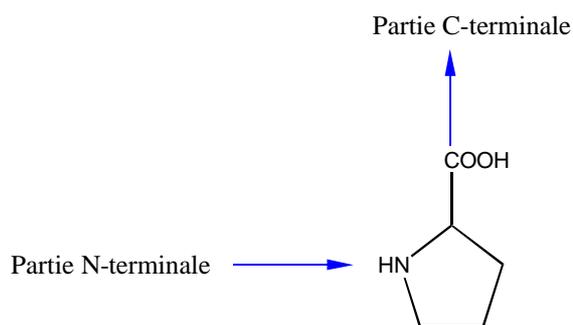


Figure I-25 : proline formant un coude (90°) dans une protéine

Tableau I-18 : longueurs d'onde utilisées en spectroscopie UV pour détecter de l'hormone de croissance entière ou ses peptides pour l'homme, le porc, le bovin et l'équin

Longueur d'onde (nm)	GH	Forme	Auteurs
210	eGH	Entière	(Bewley et Li, 1987)
	pGH	Peptides	(Violand <i>et al.</i> , 1992)
214	rhGH	Peptides	(Frenz <i>et al.</i> , 1990)
	rhGH	Peptides	(Canova-Davis <i>et al.</i> , 1996)
	rbGH	Peptides	(Chang <i>et al.</i> , 1997)
220	hGH	Entière	(Riggin <i>et al.</i> , 1987)
	rbGH	Entière	(Chang <i>et al.</i> , 1996)
	bGH	Entière	(Secchi et Borromeo, 1997)
	hGH	Entière	(Karlsson <i>et al.</i> , 1999)
278	eGH	Entière	(Saxena et Henneman, 1966)
	eGH	Entière	(Conde <i>et al.</i> , 1973)
	pGH	Entière	(Violand <i>et al.</i> , 1992)
280	bGH	Entière	(Graf et Li, 1974)
	hGH	Entière	(Teh <i>et al.</i> , 1987)
	hGH	Entière	(Teshima <i>et al.</i> , 1991)
	hGH	Entière	(Haro <i>et al.</i> , 1996)
	hGH	Entière	(Haro <i>et al.</i> , 1998)
	cGH	Entière	(Berumen <i>et al.</i> , 2004)

Lors de l'hydrolyse enzymatique, la présence de proline ralentit la réaction car elle n'est pas à proprement parler un acide aminé mais un acide iminé, son azote étant impliqué dans la fermeture du cycle. La présence du cycle pyrrolidine de la proline produit une sorte de « verrouillage structural » qui limite le degré de liberté (rotation) de la chaîne en amont immédiat. Lorsque la proline est située dans une hélice α , la distorsion produite génère un coude dans l'organisation générale de l'hélice (Figure I-25) et les enzymes peuvent avoir du mal à accéder à leur site de coupure. Pour la trypsine, les hydrolyses entre Lys-Pro et Arg-Pro seront plus lentes.

3.2.3. Méthodes de détection

3.2.3.1. Par ultraviolet (UV)

L'absorption des protéines dans l'ultraviolet est possible grâce à la présence plus ou moins abondante d'acides aminés aromatiques dans la séquence de la protéine. Cette méthode de détection non spécifique a été utilisée pour détecter l'hormone de croissance humaine, bovine, porcine et équine après une séparation par HPLC. Le Tableau I-18 présente les différentes longueurs d'onde citées dans la littérature. Il semble que les longueurs d'onde 210 et 214 nm soient préférentiellement utilisées pour détecter des peptides de la GH tandis que celles de 220, 278 et 280 nm sont utilisées pour les hormones entières.

3.2.3.2. Par spectrométrie de masse (MS)

Les hormones de croissance entières et leurs peptides issus d'hydrolyses enzymatiques ont été largement étudiées par spectrométrie de masse. Il est rapporté presque exclusivement des ionisations de molécules en mode ESI positif et en mode MALDI positif. D'autres modes d'ionisation ont été plus exceptionnellement utilisés, comme le mode « bombardement par atomes rapides » (FAB) (Frenz *et al.*, 1990 ; Teshima *et al.*, 1991 ; Violand *et al.*, 1992 ; Canova-Davis *et al.*, 1996) ou « la spectrométrie de masse de rapport isotopique » (IRMS) (Karlsen *et al.*, 2006).

Afin d'avoir un aperçu de la technologie appliquée aux GH et/ou à leurs peptides, un panel des modes d'ionisation et analyseurs de masse utilisés pour cette thématique a été synthétisé dans le Tableau I-19.

L'étude par spectrométrie de masse de l'hormone de croissance recombinante humaine a été initiée il y a près de 20 ans par Frenz (Frenz *et al.*, 1990) et Teshima (Teshima *et al.*, 1991) avec une ionisation de la molécule en FAB et une analyse obtenue grâce à des secteurs magnétiques en tandem.

Tableau I-19 : présentation des modes d'ionisation et analyseurs de masse utilisés pour l'étude des GH

Modes d'ionisation	Analyseurs de masse	GH	Auteurs	
ESI (+)	Q	rbGH	(Chang <i>et al.</i> , 1997)	
		pGH cGH eGH rpGH	(Secchi <i>et al.</i> , 2001)	
		rpGH	(Blokland <i>et al.</i> , 2003)	
	QqQ	rhGH	(Teshima <i>et al.</i> , 1991)	
		pGH	(Violand <i>et al.</i> , 1992)	
		rhGH	(Canova-Davis <i>et al.</i> , 1996)	
		bGH pGH	(Rochut <i>et al.</i> , 2000)	
		bGH rbGH rhGH	(Pinel <i>et al.</i> , 2004)	
		rbGH	(Pinel <i>et al.</i> , 2005)	
	Piège 3D	eGH reGH	(Bonnaire <i>et al.</i> , 1998)	
		hGH	(Zhan et Desiderio, 2003)	
		hGH	(Zhan <i>et al.</i> , 2005)	
		rhGH	(Jung <i>et al.</i> , 2005)	
	Q-TOF	hGH	(Karlsson <i>et al.</i> , 1999)	
		rhGH	(Jung <i>et al.</i> , 2005)	
Nano ESI (+)	Piège 3D	hGH	(Giorgianni <i>et al.</i> , 2004)	
		rbGH	(Heutmekers <i>et al.</i> , 2007)	
	Q-TOF	hGH	(Hepner <i>et al.</i> , 2005)	
MALDI (+)	TOF	bGH rbGH	(Borromeo <i>et al.</i> , 1995)	
		bGH	(Secchi et Borromeo, 1997)	
		eGH bGH pGH hGH	(Bonnaire <i>et al.</i> , 1998)	
		eGH bGH pGH hGH	(Laidler <i>et al.</i> , 1998)	
		hGH	(Karlsson <i>et al.</i> , 1999)	
		hGH	(Beranova-Giorgianni et Desiderio, 2000)	
		pGH	(Ouyang <i>et al.</i> , 2003)	
		hGH	(Zhan et Desiderio, 2003)	
		hGH	(Zhan <i>et al.</i> , 2005)	
		hGH	(Grigorian <i>et al.</i> , 2005)	
	TOF-TOF	hGH	(Hepner <i>et al.</i> , 2005)	
	FAB (+)	Secteurs magnétiques en tandem	rhGH	(Frenz <i>et al.</i> , 1990)
			rhGH	(Teshima <i>et al.</i> , 1991)
rhGH			(Canova-Davis <i>et al.</i> , 1996)	
	QqQ	pGH	(Violand <i>et al.</i> , 1992)	
	IRMS	bGH rbGH	(Karlsen <i>et al.</i> , 2006)	

A la fin des années 80, l'arrivée dans les laboratoires du MALDI-TOF et de l'ESI-Q ou ESI-QqQ, a permis d'étudier par spectrométrie de masse les hormones de croissance : hGH, rhGH, eGH, reGH, bGH, rbGH, pGH et rpGH et leurs peptides tryptiques pour réaliser la comparaison de leurs séquences en acides aminés afin de définir des homologies de séquence. Ce n'est que quelques années après, avec l'utilisation du MALDI-TOF-TOF et de la (nano)ESI-Q-TOF, que la fragmentation MS/MS des peptides a permis de confirmer la présence de modifications post-traductionnelles sur certains peptides offrant ainsi la découverte de nouveaux isoformes de GH.

A ce jour, l'application de la spectrométrie de masse à la lutte antidopage des animaux de sport ou à la sécurité chimique des aliments a permis la discrimination des hormones de croissance recombinantes de leurs formes endogènes soit par une analyse de la molécule entière, soit par l'étude des peptides produits après hydrolyse enzymatique (Borromeo *et al.*, 1995 ; Secchi et Borromeo, 1997 ; Bonnaire *et al.*, 1998 ; Laidler *et al.*, 1998 ; Rochut *et al.*, 2000 ; Secchi *et al.*, 2001 ; Blokland *et al.*, 2003 ; Pinel *et al.*, 2004 ; Karlsen *et al.*, 2006). La plupart des résultats publiés sont d'ordre fondamental car les auteurs ont tous travaillé à l'aide de standards ou d'ajouts relativement concentrés. Le seul article de mise au point d'une méthode d'identification de rGH dans le plasma concerne la détection d'un ajout de rpGH à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ dans du plasma de bovin (prise d'essai: 10 mL) par Blokland (Blokland *et al.*, 2003) au moyen d'un couplage ESI-Q. Il semble donc possible de pouvoir égaler ces résultats ou d'être plus performant en utilisant des appareils plus récents et sensibles. Aucun résultat de détection directe de l'hormone de croissance par spectrométrie de masse sur animaux traités n'a jamais jusqu'à ce jour été rapporté.

En 1998, une approche originale, dérivée du MALDI a été réalisée par Marshall (Marshall *et al.*, 1998) dans l'optique de détecter l'utilisation frauduleuse d'hormones peptidiques lors de compétitions sportives faisant intervenir des animaux. Il s'agit du SELDI, Surface Enhanced Laser Desorption Ionization. Cette technique consiste à se servir soit d'une surface de capture par interaction hydrophobe, d'un échangeur d'anions ou de cations ou d'un anticorps fixés sur la cible (société Ciphergen, Camberley, UK) pour piéger la protéine cible présente dans une matrice complexe. Dernièrement, le SELDI-TOF (Cu^{2+} -IMAC) a permis de déterminer un nouveau biomarqueur (chaîne alpha de l'hémoglobine) de l'administration de l'hormone de croissance humaine dans le sérum (Chung *et al.*, 2006).

4. MÉTHODE DE DÉTECTION DES MARQUEURS BIOLOGIQUES DE L'ADMINISTRATION DE rGH

Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode de détection directe de l'hormone de croissance suffisamment sensible et spécifique pour détecter l'administration frauduleuse d'hormone de croissance. Dans ce contexte, des marqueurs secondaires ont été déterminés et utilisés comme techniques de dépistage. Il s'agit le plus souvent des composants de l'axe somatotrope tel l'IGF-I dont la concentration est sous le contrôle de la GH. D'autres marqueurs ont été étudiés, comme la production d'anticorps anti-GH consécutive à un traitement à la GH ou bien des marqueurs de croissance de l'os.

4.1. L' IGF-1

Pendant un traitement à l'hormone de croissance, il a été observé chez l'homme (Kicman *et al.*, 1997 ; Abellan *et al.*, 2005), la vache laitière (Cisse *et al.*, 1991 ; de Boer *et al.*, 1991) ou le cheval (Buomono *et al.*, 1996 ; Noble et Sillence, 2000 ; de Kock *et al.*, 2001b ; Popot *et al.*, 2001a ; Noble *et al.*, 2007) une augmentation progressive de la concentration en IGF-1 plasmatique. La concentration en IGF-1 dans le plasma ou dans le lait peut être mesurée par immuno-essais ou par spectrométrie de masse et indiquer si l'animal a reçu récemment un traitement à l'hormone de croissance.

4.1.1. *Mesure des IGF-1 par immuno-essais*

Les IGF-1 humaine, bovine et équine étant identiques en séquence, les kits ELISA (Biocode, Belgique) ou RIA (DSL, USA) utilisés par les laboratoires des courses hippiques sont d'origine humaine et validés chez le cheval. Au laboratoire des courses hippiques français, le kit ELISA « Biocode » est utilisé en routine pour déterminer les concentrations en IGF-1 plasmatique tandis qu'en Grande Bretagne, le kit RIA « DSL » est utilisé. Chez le cheval, un seuil plasmatique de concentration en IGF-1 a été défini et proposé à 860 ng.mL^{-1} (Popot *et al.*, 2002) au-delà duquel l'animal est suspecté avoir reçu de l'hormone de croissance.

Chez le bovin, un dosage par RIA des IGF-1 dans le lait a été mis au point (Zhao *et al.*, 1991) permettant de détecter des concentrations de $2,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour les animaux témoins et de $3,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour les animaux traités à la rbGH. Cette étude était limitée en nombre d'animaux et les animaux traités ne reçurent qu'une seule dose de rbGH.

Une étude de population plus conséquente a été réalisée par Daxenberger (Daxenberger *et al.*, 1998), en mesurant par RIA dans 5777 échantillons de lait provenant d'animaux non traités des concentrations en IGF-1 allant de 1 à 83 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Devant la grande variabilité inter individus observée, il est difficile de définir un taux basal dans le lait au-delà duquel les animaux seraient suspectés d'avoir reçu de l'hormone de croissance. Dernièrement, une méthode par SPR-BIA a été développée (Guidi *et al.*, 2001) permettant de mesurer des concentrations en IGF-1 dans le lait de bovins non traités à la rbGH de l'ordre de 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Il n'existe pas à l'heure actuelle de seuil de concentration en IGF-1 dans le lait de bovins pour détecter une administration frauduleuse d'hormone de croissance.

4.1.2. Mesure des IGF-1 par spectrométrie de masse

La mesure de la concentration en IGF-1 plasmatique chez le cheval a également été réalisée dans le plasma par chromatographie d'immunoaffinité et détection quantitative par spectrométrie de masse (Bobin *et al.*, 2001 ; de Kock *et al.*, 2001a ; Popot *et al.*, 2001a ; Popot *et al.*, 2001b). Chez le bovin, une méthode similaire a été développée (Balizs *et al.*, 2006) mais ne permet pas encore d'atteindre les concentrations attendues pour être suffisamment performante.

Dernièrement, il a été rapporté chez l'homme, une méthode de quantification de l'IGF-1 plasmatique différente, utilisant la dilution isotopique et une détection des peptides d'intérêt, obtenus après digestion enzymatique par spectrométrie de masse (Kirsh *et al.*, 2007). La méthode devant être appliquée aux patients atteints d'acromégalie, la sensibilité obtenue ne permet pas d'atteindre des concentrations en IGF-1 plasmatique basse ($\mu\text{g.L}^{-1}$) car la sensibilité est de 2 à 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.2. Les IGF Binding Protein (IGFBP)

Chez l'homme, la circulation des IGF-1 dans l'organisme est associée à au moins 6 protéines de transport (IGFBP-1 à IGFBP-6). L'IGFBP-3 lie 90 % de l'IGF-1 du sérum (Laursen, 2004), c'est pourquoi lorsque les concentrations en IGF-1 augmentent, les taux circulants d'IGFBP-3 augmentent simultanément. Comme pour l'IGF-1, il a été observé chez l'homme (Kicman *et al.*, 1997) et le cheval (Noble et Sillence, 2000 ; de Kock *et al.*, 2001b) une augmentation progressive de la concentration en IGFBP-3 plasmatique pendant un traitement à l'hormone de croissance. La détection de cette molécule peut être réalisée par immuno-essais ou bien par spectrométrie de masse (Kirsh *et al.*, 2007) en détectant des concentrations dans le plasma de 4 à 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. D'autre part, chez le bovin, il a été montré par ELISA que le traitement à la rbGH faisait chuter les concentrations en IGFBP-2 (Scippo *et al.*, 1997).

4.3. Les anticorps anti-hormones de croissance

Depuis les années soixante, la production spécifique d'anticorps dirigés contre l'hormone de croissance, lorsque celle-ci est administrée au cours d'un traitement, est très documentée. Chez l'humain, il a été montré à de nombreuses reprises que le traitement à l'hormone de croissance pouvait induire la production d'anticorps spécifiques (Prader *et al.*, 1964 ; Roth *et al.*, 1964 ; Frasier et Smith, 1966). L'analyse plus approfondie de ces anticorps anti-GH humaine a montré qu'ils étaient aussi capables de reconnaître des hormones de croissance d'autres espèces animales notamment la GH porcine (Murthy et McGarry, 1971 ; Perez *et al.*, 1985). La production d'anticorps anti-GH est bien documentée pour les animaux d'élevage, le plus étudié d'entre eux étant le bovin (Zwickl *et al.*, 1990 ; Burton *et al.*, 1991) avec une détection d'anticorps obtenue par Western-Blot 28 jours après l'administration de rbGH (Pinel *et al.*, 2005).

La production d'anticorps anti-hormone de croissance humaine chez le chien a aussi été rapportée (Van Herpen *et al.*, 1994). Chez le cheval, avant la mise sur le marché de l'hormone de croissance équine recombinante, une recherche d'anticorps, consécutive à un traitement par l'hGH et la bGH avait été réalisée par RIA et avait permis une détection d'anticorps à partir de 40 jours (Bonnaire *et al.*, 1998) avec une plus forte immunisation signalée avec l'hormone humaine que l'hormone bovine.

La topographie des épitopes antigéniques des hormones de croissance bovines et équines a été étudiée par de nombreuses techniques, et des épitopes de séquence et de conformation ont été reportés. En général, quatre à cinq sites majeurs antigéniques ont été décrits sur la molécule de bGH et la majorité implique la partie N-terminale, jusqu'à 15 kDa, de l'hormone (Secchi et Borromeo, 1997). Par conséquent, le traitement d'un animal par une GH présentant une extrémité N-terminale différente de la somatotropine naturelle peut provoquer une réaction immunitaire (Scippo *et al.*, 1997). La partie N-terminale ne doit pas uniquement être perçue comme induisant seule une réaction immunitaire car la structure tridimensionnelle d'une partie de la molécule peut expliquer ce phénomène. En effet, des hormones recombinantes identiques aux natives induisent la production d'anticorps anti-GH. L'exemple le plus concret est la découverte sur l'hormone de croissance humaine, ovine, bovine et équine d'une région antigénique commune correspondant à la séquence d'acides aminés 73-128 (Poskus *et al.*, 1976 ; Zakin *et al.*, 1977). Les hormones de croissance administrées pourraient donc quelle que soit leur origine induire la production d'anticorps lors de leur administration par voie cutanée par recrutement des mécanismes de l'immunité lors de l'inflammation au point d'injection.

4.4. Autres marqueurs

Il a été montré chez le cheval que les taux d'ostéocalcine restaient élevés après la fin d'un traitement à la GH pendant près de deux mois (Price *et al.*, 2000). Récemment, il a été montré chez l'homme, par la technologie SELDI-TOF, que le suivi de la chaîne alpha de l'hémoglobine et le pro-collagen de type III pouvaient servir de nouveaux biomarqueurs de l'action de l'hGH (Chung *et al.*, 2006). Ce résultat avait déjà été observé chez l'homme où le procollagen III avait été proposé comme biomarqueur potentiel de l'administration de GH (Abellan *et al.*, 2005).

5. CONCLUSION DE LA SECONDE PARTIE

Il existe actuellement deux stratégies de mise en évidence de l'administration frauduleuse de l'hormone de croissance recombinante : l'une indirecte utilisable en dépistage et l'autre directe nécessaire à la confirmation. A l'heure actuelle, les seuls moyens de dosage de l'hormone de croissance dans les fluides biologiques (plasma, sérum et urine) sont basés principalement sur des méthodes immunologiques de type RIA ou ELISA où la différenciation entre les formes endogènes et recombinantes ne peut pas être réalisée avec robustesse. En effet, les anticorps monoclonaux, très attractifs pour différencier les hormones natives des recombinantes sont obtenus en quantité faible avec un temps d'obtention très long et par conséquent peu compatible avec une méthode utilisable en routine. De plus, les méthodes ne sont pas encore complètement éprouvées et validées.

Aujourd'hui, le dépistage d'un traitement à la rGH est réalisé en utilisant des marqueurs secondaires de l'administration de la molécule tels que l'IGF-1 où un seuil a été proposé chez les équins mais pas chez les bovins, l'IGFBP-3 ou les anticorps anti-rGH produits consécutivement à un traitement à la rGH.

Pour confirmer la présence de GH dans un échantillon, il est nécessaire d'extraire la molécule de son milieu biologique et de la purifier suffisamment pour ne pas être gêné par des molécules interférentes lors de la détection. De nombreuses techniques de purification de l'hormone de croissance présente en grande quantité dans des hypophyses ou des cellules recombinantes, ont été publiées. Or, pour détecter directement de la rGH dans le plasma à des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g.L}^{-1}$, il sera nécessaire de tester de nouvelles combinaisons de méthodes de purification car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode suffisamment sensible et spécifique pour mesurer la rGH à l'état de trace dans une matrice biologique quelle qu'elle soit. La sensibilité actuelle de détections de rGH est de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ dans le sérum. Les hormones de croissance et leurs formes recombinantes ont été cependant étudiées au cours de ces dernières années par spectrométrie de masse. L'interprétation des données de la littérature et la disponibilité de nouveaux spectromètres de masse plus performants devraient permettre de détecter le peptide N-terminal caractéristique de l'hormone de croissance équine ou bovine recombinante par LC/MS/MS. Cette technologie, associée à un nouveau protocole de purification adapté, sera indispensable pour discriminer de manière non ambiguë l'hormone de croissance endogène de sa forme recombinante dans un milieu complexe tel que le plasma.

CHAPITRE - II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tableau II-1 : références et caractéristiques des lapins utilisés pour obtenir des anticorps polyclonaux

N° de tatouage	Date de naissance	Sexe	Poids
437711	06-09-2004	femelle	2,00 kg
437726	06-09-2004	femelle	2,25 kg

Tableau II-2 : tableau récapitulatif des prélèvements et injections réalisés sur les lapins

Semaines	Prélèvements sang	Injections de reGH par lapin	Dates
1	T0 blanc (10 mL)	75 µg	2 décembre 2004
3		75 µg	14 décembre 2004
5	T1 (20 mL)		27 décembre 2004
6	T2 (20 mL)	75 µg	7 janvier 2005
8	T3 (20 mL)		21 janvier 2005
10		400 µg	01 février 2005
12	T4 (20 mL)		15 février 2005
14	<i>Sacrifice des animaux</i>		02 mars 2005

PARTIE - 1 MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Deux différentes expérimentations animales ont été conduites au cours de la thèse : la première, réalisée au Laboratoire de Bactériologie Médicale et Moléculaire des Leptospires (ENVN - Nantes) a permis d'obtenir des anticorps polyclonaux de lapins anti-reGH dans le but de réaliser une colonne d'immunoaffinité. La seconde, réalisée au centre expérimental de Coye la Forêt dépendant du Laboratoire des Courses Hippiques (LCH) a permis d'administrer de l'hormone de croissance équine recombinante à des chevaux d'expérimentation afin de collecter du plasma, du sérum et de l'urine en vue de disposer de matrices pour rechercher l'hormone de croissance équine recombinante par une méthode directe et d'en réaliser une cinétique d'élimination. Il a été également prévu que soit réalisée au cours de cette phase la collecte de sérum sur 6 mois pour étudier les anticorps potentiellement produits consécutivement à l'administration de cette molécule.

1. PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX ANTI-reGH CHEZ LE LAPIN

Deux lapins KBL (NZW) obtenus auprès de la SA « Elevage Scientifique des Dombes » dont les références et caractéristiques sont notées dans le Tableau II-1 ont été utilisés pour la production d'anticorps polyclonaux anti-reGH. Les tubes de prélèvement utilisés sont les tubes Hemosept à gel séparation (société Labo moderne).

La première injection d'hormone de croissance équine recombinante a été réalisée par dissolution de l'hormone dans de l'eau physiologique et complétée par 50 % d'adjuvant complet de Freund (huile minérale et paroi de mycobactérie) pour obtenir un effet stimulant et sensibilisant sur la production des anticorps. Les suivantes ont été réalisées avec 50 % d'adjuvant incomplet de Freund (huile minérale) favorisant la réaction d'inflammation pour stimuler les cellules immunitaires. Le Tableau II-2 résume les différentes étapes du protocole d'immunisation des lapins. Les injections ont été réalisées en sous-cutanée sur le dos de l'animal et les prélèvements dans l'artère centrale de l'oreille. Les tubes sont placés une nuit à 4°C et centrifugés le lendemain matin 15 min à 3000 rpm pour obtenir le sérum. Les tubes sont congelés à -20°C avant utilisation.

A chaque prélèvement, un Dot-Blot est réalisé pour estimer la production d'anticorps. La technique de « Dot-Blot » permet d'estimer le taux d'anticorps que produit un animal contre une molécule antigénique sans avoir besoin de prélever des quantités importantes de sang.



Figure II-1 : flacon d'EquiGen-5[®] contenant l'hormone de croissance équine recombinante



Figure II-2 : prélèvement de sang dans la veine jugulaire (cheval « Palladia »)

Grâce à cette technique, il a été possible de suivre l'évolution de la production d'anticorps anti-reGH et de constater que l'immunisation était lente et trop faible et qu'il fallait par conséquent réaliser une forte injection d'antigène (reGH) en semaine 10 pour espérer obtenir une réponse immunitaire satisfaisante. Après 4 semaines, les sérums dilués au 1/4000 ont été révélés positifs indiquant ainsi que le taux d'anticorps anti-reGH présents dans le sérum des lapins était suffisant et que la dernière injection avait eu l'effet escompté, à savoir stimuler fortement la production d'anticorps. Les lapins ont ensuite été sacrifiés et leur sang prélevé dans les mêmes conditions que pour les prélèvements intermédiaires et conservé à -20°C avant purification ultérieure des anticorps.

2. ADMINISTRATION D'HORMONE DE CROISSANCE À DES CHEVAUX DE COURSES

Les chevaux réformés de courses du centre expérimental de la Fédération Nationale des Courses Françaises (FNCF) sont tous des pur-sang anglais. Ils sont nourris avec un aliment en granulés destiné aux chevaux effectuant un travail de forte intensité : « Hippo 63 » produit par UAR. L'aliment est fabriqué sous contrôle qualité UAR. Cet aliment est considéré comme l'aliment de choix pour les animaux de sports ou de courses et est donc particulièrement bien adapté aux purs-sangs du centre expérimental pour que leur physiologie soit la plus proche possible de celle des chevaux non réformés.

L'hormone de croissance équine recombinante, contenue dans un flacon d'EquiGen-5[®] (Figure II-1) est reprise dans 2 mL d'eau PPI pour donner une solution à 5 mg.mL⁻¹. Cette solution doit être utilisée dans les 48 heures après reconstitution et stockée à 4°C.

2.1. Voie d'administration et prélèvement des échantillons

Les injections d'hormone de croissance ont été réalisées par voie sous-cutanée à l'encolure (encolure gauche les jours pairs et encolure droite les jours impairs). Avant de pratiquer l'injection, une désinfection de la zone de l'encolure a été réalisée puis après pincement d'un pli de peau, l'aiguille a été enfoncée dans le sens longitudinal du pli et la solution a été injectée doucement à l'animal.

Le sang a été collecté dans la veine jugulaire de l'animal (Figure II-2). Le plasma a été obtenu sur un tube hépariné (9 mL) après centrifugation à 3 000 rpm pendant 10 minutes puis séparation du plasma et congélation immédiate (-80°C). Le sérum a été collecté sur tubes secs (10 mL) après décantation 24 h à 4°C puis centrifugés (15 min, 3000 rpm) le lendemain avec identification et congélation rapide à -80°C.



Figure II-3 : prélèvement d'urine (cheval « Et Caetera »)

Tableau II-3 : caractéristiques des chevaux choisis pour recevoir le traitement à l'hormone de croissance équine recombinante injectée par voie sous-cutanée

Référence L.C.H.	Nom du cheval	Age	Sexe	Poids
497/eGH	Palladia	5 ans	Hongre	547 kg
498/eGH	Grandet	5 ans	Mâle	575 kg

Tableau II-4 : volume de solution d'EquiGen-5[®] et quantités de reGH injectés par cheval

Référence L.C.H.		Du 28/04 au 04/05	Du 05/05 au 11/05	12 et 13/05
497/eGH	Volume	2 mL	2,7 mL	3,25 mL
	Quantité	10 mg	13,5 mg	16,25 mg
498/eGH	Volume	2,1 mL	2,9 mL	3,5 mL
	Quantité	10,5 mg	14,5 mg	17,5 mg

L'urine a été collectée par miction naturelle de l'animal dans un pot de prélèvement d'urine (Figure II-3) puis aliquotée dans des flacons plastiques en polypropylène (3x30mL + le reste dans un flacon de plus grande capacité) identifiés et congelés rapidement (-20°C).

2.2. Expérimentation 497 et 498

L'objectif de cette expérimentation consiste à pratiquer un traitement à l'hormone de croissance équine recombinante sur deux chevaux réformés de courses dont les caractéristiques sont notées dans le Tableau II-3 et de disposer de matrices biologiques (plasma, sérum, urine) pour suivre l'impact de ce traitement à court terme (mesure IGF-1), de détecter la présence de reGH par une méthode directe et enfin d'observer les effets de ce traitement sur une période d'au moins 6 mois (recherche d'anticorps).

Les plasmas, sérums et urines ont été collectés pendant 7 jours avant le début du traitement (J₋₇ à J₋₁) afin de réaliser une série de blancs. Le traitement a été réalisé à la dose de 18 µg.kg⁻¹ la première semaine (J₊₁ à J₊₇) et 25 µg.kg⁻¹ la deuxième semaine (J₊₈ à J₊₁₄). Deux jours à 30 µg.kg⁻¹ ont été ajoutés pour clôturer l'expérimentation (J₊₁₅ à J₊₁₇). Les différents volumes et quantités injectés par jour sont présentés dans le Tableau II-4.

Le sang et les urines sont collectés tous les jours de J₊₁ à J₊₂₀, puis tous les deux jours de J₊₂₀ à J₊₃₀. A partir de J₊₃₀, le plasma et le sérum sont collectés tous les 15 jours pendant 6 mois. Lors des prélèvements, 100 mL de sang sont répartis en 50 mL de sang collectés sur tubes héparinés (9 mL) et 50 mL de sang collectés sur tubes secs (10 mL) avec un prélèvement d'urine d'au moins 90 mL.

2.3. Expérimentation 563

L'objectif de cette expérimentation est d'établir une cinétique d'élimination de reGH pendant quelques heures après l'injection d'EquiGen-5[®], administrée par voie sous-cutanée. Les concentrations plasmatiques maximales ainsi que la demi-vie de l'hormone recombinante seront alors établies. Afin de ne mesurer que le signal de l'hormone recombinante, la sécrétion pulsatile d'hormone native a été bloquée par administration d'un inhibiteur de la GH endogène. L'octréotide (Sandostatine[™]), analogue synthétique de la somatostatine à durée d'action prolongée, a été choisi car il a déjà été utilisé chez le cheval (Aurich *et al.*, 2003) à la dose **de 100 µg en sous-cutané** et non de 100 mg comme indiqué dans l'article correspondant. Un essai témoin est nécessaire. Chez l'homme, les concentrations plasmatiques maximales d'octréotide sont atteintes en 30 min et la demi-vie d'élimination est de l'ordre de 100 min.

Tableau II-5 : caractéristiques du cheval choisi pour définir la cinétique d'élimination de l'hormone de croissance équine recombinante après une injection par voie sous-cutanée

Référence L.C.H.	Nom du cheval	Age	Sexe	Poids
563	Raft Song	17 ans	Mâle	557 kg

Tableau II-6 : volumes de solution et quantités d'EquiGen-5[®] et de Sandostatine[®] administrés au cheval « Raft Song » pour déterminer la cinétique d'élimination de reGH avec inhibition de la production endogène d'eGH

Solution		Premier Jour	Deuxième Jour
Sandostatine [®]	Volume	2 mL	2 mL
	Quantité	100 µg	100 µg
EquiGen-5 [®]	Volume	0 mL	2,8 mL
	Quantité	0 mg	14 mg

L'octréotide se trouve sous la forme d'une solution à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ en ampoules de 1 mL. Un cheval de course réformé dont les caractéristiques sont notées dans le Tableau II-5 a été choisi pour recevoir l'injection de cette expérimentation.

100 μg d'octréotide puis, 15 min après, 14 mg d'hormone de croissance ont été injectés en sous-cutané (Tableau II-6). 30 mL de sang sont collectés sur tubes héparinés 90, 60 et 30 min avant l'injection d'octréotide puis 8, 15, 25, 40, 60, 90, 120 et 180 minutes. Les prélèvements sont stockés à -20°C .

2.4. Expérimentation 586

Cette expérimentation fait suite à l'expérimentation 563 et a pour objectif d'établir une cinétique d'élimination plus complète de l'hormone de croissance équine recombinante dans le plasma après administration par voie sous-cutanée, c'est-à-dire en collectant du plasma au-delà de 3 heures après l'injection. Un dosage par RIA des échantillons de l'expérimentation précédente a permis de définir que la sécrétion d'hormone naturelle (eGH) était non détectable (inférieure à 1 ng.mL^{-1}) et que par conséquent, cette nouvelle expérimentation pourrait être réalisée sur le cheval Raft Song sans administration préalable d'octréotide. 50 mL de sang ont été prélevés sur tubes héparinés à chaque temps suivant puis le plasma obtenu a été congelé à -20°C : avant administration: - 30 min, - 15 min puis après administration : 8 min, 25 min, 40 min, 60 min, 90 min, 120 min et 180 min après administration puis 4h, 5h30, 6h30, 7h30, 8h30, 9h30, 11h30, 13h30, 15h30, 24h, 26h, 36h et 48 heures après administration. La fin de la cinétique d'élimination étant inconnue, le sang est encore collecté après 4, 5 et 7 jours.

3. RÉFÉRENCES DU MATÉRIEL BIOLOGIQUE UTILISÉ

L'hormone de croissance équine recombinante (EquiGen-5[®]) a été obtenue auprès de Bresagen Limited (Thebarton, Australie). Les hormones de croissance équine, bovine, porcine et recombinante bovine proviennent du laboratoire du Dr Parlow au Harbor-UCLA Medical Center (Torrance, CA, USA). L'octréotide (Sandostatine[®]) a été obtenue auprès du laboratoire Novartis (Bâle, Suisse). Les peptides N-terminaux correspondant à l'hydrolyse trypsique de reGH (MFPAMPLSSLFANAVLR), d'eGH (FPAMPLSSLFANAVLR), de rbGH (MFPAMSLSGLFANAVLR) ont été synthétisés par la société Millegen (Labège, France). Les colonnes prégreffées avec des IgG anti-eGH et anti-bGH nous ont été fournies par Affiland (Liège, Belgique). Les anticorps secondaires anti-IgG de cheval marqués à la phosphatase alcaline ou à la peroxydase ont été obtenus auprès de Jackson ImmunoResearch (Newmarket, Grande Bretagne).

PARTIE - 2 MÉTHODES BIOCHIMIQUES DE PURIFICATION DES PROTÉINES

1. TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION

1.1. Précipitation par le sulfate d'ammonium

La stratégie consistant en l'utilisation d'une solution saturée de sulfate d'ammonium a été préférée aux pesées pour des raisons de commodité et de facilité d'utilisation de la méthode lors de la réalisation de séries importantes d'échantillons (supérieures à 20). Les calculs d'obtention des différents pourcentages de saturation en sulfate d'ammonium sont présentés dans le Tableau II-7 où les paramètres de prise d'essai de l'échantillon ont été fixés à 3 mL et le volume final fixé à 30 mL. La solution de sulfate d'ammonium est ajustée à pH 6,9 grâce à quelques gouttes de NaOH 32 % avant d'être stockée à 4°C. Les réactions de précipitation sont réalisées à température ambiante sous agitation magnétique douce pendant 1h30 puis mises à décanter pendant 15 à 20 heures à 4°C. L'impact des variations de température sur le pourcentage de saturation est jugé négligeable d'autant plus qu'il est communément admis que la saturation en sulfate d'ammonium ne varie pas de façon significative entre 4°C et 25°C (Harlow et Lane, 1991).

1.2. Précipitation par le méthanol

Dans cette méthode de précipitation, 5 mL de méthanol à -20°C sont ajoutés à 1 mL de solution protéique. Pour des concentrations en protéines dissoutes très faibles (< 1 µg), il est recommandé de laisser la précipitation plus d'une heure. Les échantillons ont donc été laissés 1h30 à -18°C avant d'être centrifugés 15 min à 4000 rpm. L'ajout de solvant organique comme agent de précipitation a permis d'éliminer les composés liposolubles à froid permettant ainsi de réaliser deux étapes en une.

1.3. Précipitation par l'acide caprylique pour purifier des IgG

1.3.1. Méthode « initiale »

En Eppendorf[®], 870 µL d'échantillons (plasma ou sérum) sont mélangés à 80 µL d'acide chlorhydrique 0,5 M pour ajuster le pH à 5 – 6, puis sont agités doucement au vortex. Cinquante microlitres d'acide octanoïque (caprylique) sont ensuite ajoutés goutte-à-goutte. La solution est mélangée par aspiration et refoulement jusqu'à ce qu'elle ait un aspect opaque.



Figure II-4 : dépôt de 260 μ L de plasma et le mélange avec 15 μ L d'HCl 0,5 M et 25 μ L d'acide caprylique dans une microplaque 96 puits de capacité 450 μ L à fond conique



Figure II-5 : mélange par aspiration et refoulement à la pipette multicanaux pour optimiser la précipitation des échantillons de plasma



Figure II-6 : centrifugation des microplaques à puits coniques recouvertes d'une protection

La précipitation est réalisée 1 h à température ambiante sous agitation vigoureuse au vortex tous les ¼ d'heure. Une centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 min à température ambiante est réalisée, permettant de prélever le surnageant à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille, ensuite retirée pour disposer à la place un filtre de porosité 0,22 µm. L'échantillon est doucement filtré, puis le filtrat est conservé dans un 2^{ème} Eppendorf® à 4°C pendant une semaine ou à -20°C pendant plusieurs mois. Les concentrations des anticorps ont été déterminées avec le kit Protein Assay (BioRad), utilisant le principe de dosage de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) en utilisant une gamme de concentration de BSA.

1.3.2. Méthode « miniaturisée »

Dans une microplaque à puits coniques, 15 µL d'acide caprylique puis 25 µL d'acide chlorhydrique 0,5 M sont déposés à la pipette multicanaux. 260 µL d'échantillons de plasma sont ensuite ajoutés (Figure II-4). La solution est mélangée par aspiration et refoulement jusqu'à ce qu'elle ait un aspect opaque. La précipitation est réalisée 15 min à température ambiante. A nouveau, la solution est mélangée par aspiration et refoulement mais cette fois avec une pipette multicanaux (Figure II-5). La plaque couverte est centrifugée 20 min à 4100 rpm à température ambiante (Figure II-6). 100 µL de surnageant sont transférés avec une pipette multicanaux dans une 2^{ème} plaque à puits coniques. Une nouvelle centrifugation de 10 min à 4100 rpm à température ambiante est réalisée. Pour conservation les échantillons à 4°C pendant une semaine ou à -20°C pendant plusieurs mois, la plaque est recouverte d'une membrane de protection 96 puits adaptée.

1.3.3. Purification d'anticorps pour IAC

Les anticorps sont purifiés à partir du sérum des lapins sacrifiés par centrifugation à 3800 rpm à 4°C pendant 15 minutes. La première précipitation est réalisée grâce à l'acide caprylique en milieu acide. Le sérum est acidifié en ajoutant à deux volumes de sérum une solution d'acétate de sodium (60 mM, pH 4). Le pH est ajusté à 5 avant d'ajouter 0,75 mL d'acide caprylique pour 10 mL de sérum à purifier (méthode IgG de lapins). Le mélange est agité à température ambiante pendant 30 minutes puis centrifugé 10 minutes à 3800 rpm à 4°C. Les surnageants sont prélevés, filtrés sur membranes de porosité 0,45 µm et leurs volumes mesurés. Une solution de sulfate d'ammonium saturée est ajoutée aux surnageants pour réaliser une précipitation à 50 % de saturation en sel. Les anticorps alors précipités sont dialysés pendant 48 heures contre du tampon PBS, 0,1 % azide de sodium, pH 7,2 à 4°C. Les concentrations des anticorps ont été déterminées avec le kit Protein Assay (BioRad).

2. TECHNIQUES DE CONCENTRATION

2.1. Concentration par ultrafiltration

2.1.1. Exclusion stérique

Des filtres d'ultrafiltration Vivaspin[®] de capacité 20 mL et de seuil de coupure 5, 10, 50, 100 kDa ont été utilisés pour des mises au point d'extraction et de concentration de l'hormone de croissance équine recombinante dans le plasma ou l'urine. Les centrifugations ont été réalisées à température ambiante en moyenne 20 minutes à 4000 rpm.

2.1.2. Membrane microspin Vivapure[®] C₁₈

Lors de la mise au point de la méthode, après l'hydrolyse enzymatique de reGH par la trypsine, les peptides ont été dessalés et concentrés sur colonne microspin Vivapure[®] C₁₈. Avant de déposer l'échantillon, la membrane a été lavée 2 fois avec 200 µL d'ACN 0,1% TFA (centrifugation d'1 min à 2000 rpm) puis équilibrée 2 fois avec 200 µL d'eau MilliQ 0,1% TFA (centrifugation 2 min à 2000 rpm). Au moment du dépôt, 10 µL de TFA 2 % ont été ajoutés au mélange peptidique. Les échantillons ont été centrifugés 4 min à 2000 rpm pour les faire pénétrer dans la phase. Les échantillons ont ensuite été lavés 2 fois avec 200 µL d'eau MilliQ 0,1% TFA (centrifugation 4 min à 2000 rpm). Les dernières traces d'eau ont été éliminées par une centrifugation d'1 min à 11000 rpm. L'élution des peptides a été obtenue avec 100 µL d'une solution 20/80 eau MilliQ-ACN 0,1% TFA (2 min à 2000 rpm puis 1 min à 11000 rpm). Les fractions collectées sont évaporées en insert HPLC sous azote à 48°C et reprises par 20 µL d'une solution de 70/30 H₂O/ACN, 0,1% AF, conditions initiales de la LC/MS.

2.2. Concentration par évaporation

La concentration des échantillons par évaporation sous azote en bain marie à 48°C (TurboVap[®]) a été réalisée après l'élution de reGH provenant des cartouches SPE et après l'étape de précipitation des protéines par le méthanol à -20°C. D'autre part, après digestion enzymatique de reGH, les peptides ont été concentrés par évaporation grâce à un système de banc chauffant. Pour éviter les contaminations de l'échantillon, des pipettes Pasteur en verre ont été utilisées comme embouts à usage unique.

Tableau II-8 : nom, références et caractéristiques des différentes cartouches SPE testées pour mettre au point la méthode de détection directe de reGH dans le plasma

Nom	Société	Capacité	Type de phase	Porosité (Å)
SDSC18	Carlo Erba (Peypin, France)	500 mg/6 mL	C ₁₈	60
Widepore C4	JT Baker (Phillipsburg, USA)	500 mg/6 mL	C ₄	275
XWP	Interchim (Montluçon, France)	500 mg/6 mL	polymère	500
WC4	Interchim (Montluçon, France)	500 mg/6 mL	C ₄	300
BondElut EWP	Varian (Les Ulis, France)	500 mg/6 mL	C ₁₈	500
LMS	Varian (Les Ulis, France)	100 mg/3 mL	polymère	300
PPL	Varian (Les Ulis, France)	100 mg/3 mL	polymère	150

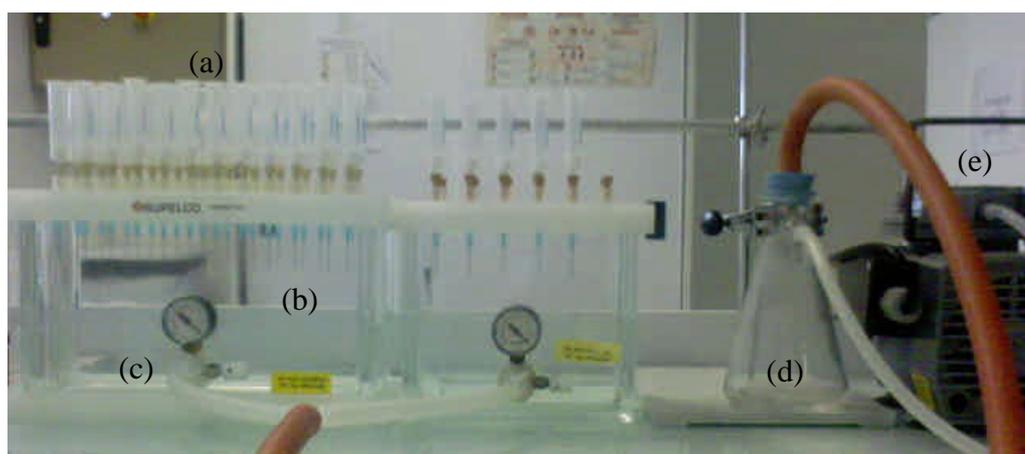


Figure II-7 : système de deux VacElut couplés utilisé lors de la thèse : (a) cartouches, (b) support, (c) manomètre, (d) trompe à eau, (e) pompe à vide électrique

3. EXTRACTION EN PHASE SOLIDE (SPE)

Diverses cartouches SPE ont été testées dont les noms, références et caractéristiques sont présentés dans le Tableau II-8. La mise au point a permis de définir que les cartouches WC4 Interchim (C₄, 500 mg, 6 mL, 300 Å) étaient les mieux adaptées pour la détection directe de reGH dans le plasma. Pour éviter le relargage de métaux et l'activation de metalloprotéases, les tubes en verre borosilicaté permettant la collecte des fractions ont été lavés à l'eau puis à l'acétone avant d'être séchés à l'étuve à 60 °C. La SPE a été réalisée en VacElut (Figure II-7) car les essais d'automatisation effectués au moyen d'un RapidTrace n'ont pas permis d'atteindre les objectifs. Le conditionnement des cartouches a été réalisé par ajout successif de 10 mL de méthanol, 10 mL d'eau MilliQ et 10 mL de tampon phosphate pH 6 (0,1 M). Pour éviter le colmatage des cartouches par des résidus de protéines non dissoutes, les échantillons sont centrifugés 5 min à 4000 rpm avant d'être déposés sur les cartouches. Un lavage avec 5 mL d'eau MilliQ 0,1% TFA et un lavage avec 5 mL de 70/30 H₂O/ACN 0,1% TFA ont été réalisés avant d'éluer de la fraction contenant reGH avec 7 mL d'un mélange 20/80 H₂O/ACN 0,1 % TFA. L'échantillon collecté a été homogénéisé et concentré par évaporation (TurboVap) 45 min à 48 °C pour obtenir un volume finale de 1 mL avant de subir la précipitation par le méthanol à -20°C.

4. CHROMATOGRAPHIE D'IMMUNOAFFINITÉ

La chromatographie d'immunoaffinité (IAC) a été développée pour permettre de capturer par un anticorps spécifique la molécule de reGH dans l'échantillon à analyser. Une colonne prégreffée avec des IgG anti-eGH et une autre avec des IgG anti-bGH ont été testées. Parmi ces colonnes, seule la colonne contenant des IgG anti-bGH a permis d'aboutir à une détection de reGH. D'autre part, une colonne vierge a été greffée par des anticorps de lapin anti-rbGH.

4.1. Colonne prégreffée avec IgG anti-bGH

Le conditionnement de la colonne Affiland prégreffée avec des anticorps de lapin anti-bGH a été réalisé avec 3x4 mL de glycine 50 mM pH 8. Après le dépôt de l'échantillon, un lavage a été effectué avec 3x4 mL de glycine 50 mM pH 8. D'après le protocole délivré par le fournisseur, l'élution doit être réalisée en utilisant 1,6 mL de glycine 50 mM pH 2,5. La régénération de la colonne a été permise grâce à 3x4 mL de glycine pH 8, 4 mL de glycine 0,1 M HCl pH 2, puis 4 mL NaCl 2 M et enfin 4 mL de tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,4. Différentes conditions d'élutions ont été testées Les conditions d'élution ont été optimisées avec 2 mL d'une solution contenant 250 mM NaCl, 25 mM NaOH, 10 % ACN.

Tableau II-9 : composition des gels d'acrylamide à 4, 6, 8 et 12 % utilisés lors des séparations électrophorétiques de protéines

	4 %		6 % (80-350 kDa)		8 % (40-200 kDa)		12 % (10-40 kDa)	
	1 gel	2 gels	1 gel	2 gels	1 gel	2 gels	1 gel	2 gels
Eau Milli Q (mL)	1,475	2,950	3,825	7,65	3,475	6,950	2,475	4,950
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (mL)	-	-	2,000	4,000	1,875	3,750	1,875	3,750
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (mL)	0,625	1,250	-	-	-	-	-	-
SDS 10 % (µL)	25	50	100	200	75	150	75	150
Protogel 30 % (µL)	325	650	1500	3000	2000	4000	3000	6000
APS 10 % (µL)	19	38	75	150	75	150	75	150
Temed (µL)	3,75	7,5	7,5	15	7,5	15	7,5	15

4.2. Colonne vierge à greffer

La composition des tampons utilisés pour le greffage de colonne est présentée en annexe. Les différentes solutions tampons ont été préparées, filtrées et dégazées sur des membranes de porosité 0,22 μm et avant d'être conservées à +4°C.

La phase de la colonne Amersham est un gel d'agarose constitué de fonctions N-Hydroxy-Succinimide (NHS) sur lesquelles les anticorps d'intérêt vont se coupler de façon covalente. La colonne Amersham NHS-activée de format 5 mL est fournie dans l'isopropanol pour préserver la stabilité des groupements NHS. L'alcool a été éliminé lors du conditionnement du gel par 3x10 mL de HCl 1 mM. La solution contenant le ligand désiré a ensuite été déposée. La colonne a été laissée 30 minutes à température ambiante afin de réaliser le couplage. La fraction éluée de la colonne (15 mL de tampon de couplage) a été collectée afin d'effectuer la mesure de l'efficacité de couplage des anticorps. Les groupements NHS qui n'ont pas été couplés à l'anticorps polyclonal anti-rbGH et les liaisons non spécifiques ont été saturées par passages successifs de tampons A et B. La colonne a été conservée à 4°C dans du tampon de stockage.

Le rendement de couplage des anticorps anti-rbGH sur la phase NHS a été déterminé en comparant les densités optiques à 280 nm de la solution d'anticorps utilisée lors de l'étape de conditionnement de la colonne d'IAC avec celle de la solution éluée à la suite du couplage. Différentes conditions d'élutions ont été testées, le choix a été fait de travailler avec 70/30 éthanol/eau (v/v) en tampon acétate 0,2 M pH= 5,6.

5. TECHNIQUES DE SÉPARATION ÉLECTROPHORÉTIQUES

5.1. Électrophorèse monodimensionnelle (E1D)

Le gel d'électrophorèse utilisé pour séparer les protéines selon leur poids moléculaire est un gel de polyacrylamide (Tableau II-9, 8 x 8 cm, 1 mm, 12%) divisé en deux parties : le « stacking gel » permettant la focalisation des protéines avant qu'elles n'atteignent le « resolving gel » permettant leur séparation. Des puits de dépôt ont été réalisés au niveau du stacking gel à l'aide d'un peigne. Les échantillons ont été portés 3 min à 100°C avant de déposés (20 à 30 μL) dans chacun puits. Un puits a été réservé au dépôt de 4 à 8 μL d'une solution de marqueurs de poids moléculaire (BioRad). La migration a été effectuée en deux étapes, la première à 120 V pendant 20 min permettant la focalisation des protéines et la seconde à 180 V pendant 40 à 45 min permettant la séparation des protéines du mélange.

Tableau II-10 : composition du tampon permettant de solubiliser les protéines et permettant une réhydratation active optimale du « strip »

Réactifs ou produits	Quantités
Urée 7 M	840 mg
Thiourée 2 M	304 mg
Chaps 65 mM	80 mg
DTT 20 mM	200 μ L de DTT 0,2M
Biolytes 3-10	10 μ L
Bleu de bromophénol	20 μ L de 0,1% (W/V)
H ₂ O Milli-Q	qsp 2 mL

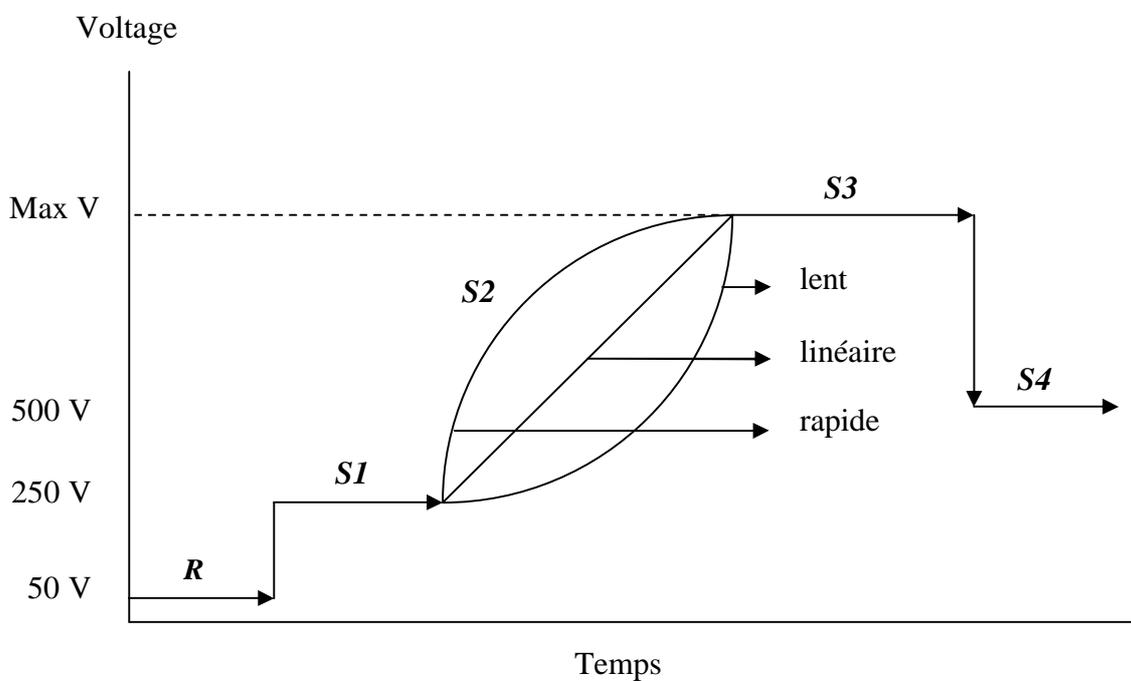


Figure II-8 : représentation graphique des différentes tensions appliquées au « strip » lors de l'étape de réhydratation active et de l'étape de focalisation des protéines (Protean IEF Cell)

Le système d'électrophorèse monodimensionnel utilisé comprend un module Mini-Protean 3 (Bio-Rad) alimenté par un PowerPac Basic 100-120/220-240 V (BioRad) et un module pour couler deux gels de 1 mm d'épaisseur contenant 2D/Prep, 5 ou 10 puits chacun (BioRad).

5.2. Électrophorèse bidimensionnelle (E2D)

La première étape de l'E2D consiste à séparer les protéines contenues dans un mélange selon leur point isoélectrique (pI). Pour ce faire, il est nécessaire de solubiliser l'échantillon protéique dans un tampon permettant une isoélectrofocalisation optimale. Les protéines ont été préalablement précipitées afin de les faire pénétrer par réhydratation (active ou passive) dans un strip à gradient de pH immobilisé (IPG-strip). La composition de ce tampon (Tableau II-10) est inspirée de données Bio-Rad faisant références aux travaux de Thierry Rabilloud (Rabilloud *et al.*, 1997). L'urée et la thiourée sont des chaotropes, c'est-à-dire qu'ils vont promouvoir la dénaturation et la solubilisation des chaînes polypeptidiques, en cassant les interactions non covalentes. Le CHAPS est un détergent non ionique, il va recouvrir les zones les plus hydrophobes des protéines dénaturées et ainsi faciliter la solubilisation des protéines en minimisant les agrégations. Les ampholytes porteurs augmentent la solubilité des protéines et assurent une conductivité uniforme au cours de la focalisation. Le bleu de bromophénol 0,1%, permet de visualiser l'étape de réhydratation ainsi que la focalisation des protéines.

Les IPG-strips choisis pour réaliser la focalisation de l'hormone de croissance équine recombinante (pI : 6,8) ont 7 cm de long et couvrent une gamme de pH comprise entre 5 et 8. Le volume de réhydratation conseillé par Bio-Rad est de 125 μ L mais il est souvent possible de travailler à +/- 20 % afin d'incorporer une quantité plus grande de protéines.

La Figure II-8 représente les différentes tensions appliquées au strip lors de l'étape de réhydratation et de l'étape de focalisation des protéines. Il est possible de travailler en réhydratation (**R**) active ou passive, le choix est fait de travailler en mode actif car il permet des dépôts plus importants et améliore la pénétration des protéines de hauts poids moléculaires dans le gel. La réhydratation s'effectue à 50 V, 20°C pendant 11 à 16 h dans de l'huile minérale pour empêcher l'évaporation. Lors de la focalisation, le voltage est régulé à 50 μ A/strip. Cette régulation permet l'élimination des petites molécules avant de mobiliser les protéines lorsque le voltage atteindra des valeurs plus élevées. Le temps nécessaire pour atteindre les voltages élevés dépendra donc de la composition de l'échantillon et de la solution de réhydratation. Lorsque l'étape de réhydratation active est réalisée, les petites molécules sont déjà mobilisées pour s'évacuer et la montée en voltage est plus aisée.

Tableau II-11 : composition du tampon d'équilibration du strip préliminaire à la seconde dimension (SDS-PAGE)

Réactifs ou produits	Quantités
Urée 6 M	3,6 g
SDS 2%	20 μ L de SDS 10%
Tris-HCl 0,375 M pH 8,8	2,5 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8
Glycérol 20 %	2 mL
Bleu de bromophénol 0,1%	100 μ L
H ₂ O MilliQ	Qsp 10 mL

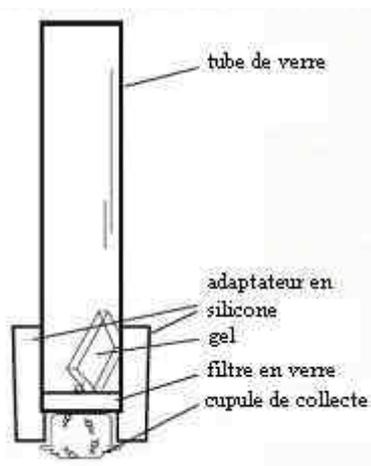


Figure II-9 : schéma d'une des 6 parties du module d'électroélution de protéines

L'étape de focalisation est divisée en 3 parties : **S1** (250 V, 15 min) permet d'appliquer un faible voltage aux strips pour éliminer les sels et les contaminants chargés, **S2** permet d'atteindre le voltage maximum désiré (4000 V pour un strip de 7 cm) par 3 moyens : lent, linéaire ou rapide, **S3** est l'étape de focalisation réelle où le strip doit atteindre 20000 V/heure. **S4** est une étape facultative qui permet de maintenir à 500V la tension dans le strip après que la séquence soit arrêtée pour prévenir la diffusion des protéines focalisées ou des protéines focalisées en dehors de la gamme de pH du strip.

Le strip peut ensuite être stocké à -20°C pendant une semaine ou indéfiniment à -80°C avant la réalisation de l'étape de seconde dimension (SDS-PAGE). Avant de déposer l'IPG-strip sur le gel de seconde dimension, il est nécessaire d'ioniser les protéines avec du SDS. Dans le cadre de ce travail, les étapes de réduction des ponts disulfures par le DTT et alkylation par le IAM pour éviter que les ponts ne se reforment ou se forment avec un autre thiol libre ne sont pas réalisées. Le Tableau II-11 indique la composition du tampon d'équilibration. Le strip est rééquilibré pendant 20 min avec 3 mL de tampon sous agitation à température ambiante. Le strip est déposé face plastique contre la grande plaque de verre et est recouvert d'une solution à 1% d'agarose low melting pour permettre une bonne jonction entre le haut du gel et la base du strip. Cette étape est délicate car il faut éviter la formation de bulles d'air. Les protéines migrent à 180 V (voltage constant) pendant 45-50 min.

5.3. Révélation des protéines

La coloration des protéines a été réalisée soit avec le colorant BioSafe (prêt à l'emploi) ou soit avec une solution de bleu de Coomassie réalisée au laboratoire. Dans le premier cas, la décoloration est réalisée avec de l'eau Milli-Q, dans le second, elle est réalisée avec une solution contenant 1/5 d'acide acétique et 4/5 de éthanol dilué au 1/2 par de l'eau Milli-Q.

5.4. Électroélution de protéines

Après une électrophorèse E1D ou E2D, le gel contenant les protéines à extraire est lavé abondamment à l'eau. Les bandes d'intérêt ou les spots sont découpés dans l'eau avant d'être transférés dans les tubes de verre de l'appareil (Figure II-9). La cupule de collecte des protéines est très délicatement recouverte avec 0,5 mL de tampon (0,4 M NH_4HCO_3 , 0,5 % SDS). Délicatement, les tubes de verre sont recouverts de tampon (0,05 M NH_4HCO_3 , 0,1 % SDS) pour éviter la formation de bulles. Ensuite, 600 mL de ce tampon sont ajoutés dans la cuve. Les échantillons sont incubés 2 à 3 heures avant de réaliser l'électroélution à 10 mA/tube à ampérage constant pendant 15 heures sous agitation magnétique vigoureuse.

Le tampon de migration est ensuite enlevé de la cuve à la pipette pour être remplacé par un tampon ne contenant pas de SDS (0,01 M NH_4HCO_3 , 0 % SDS). L'électrodialyse du SDS est réalisée pendant 2 heures. L'échantillon de protéines électroéluées est récolté dans la cupule (400 μL) puis celle-ci est rincée avec 200 μL de tampon sans SDS. Les fractions sont poolées avant de subir l'hydrolyse enzymatique. Le système d'électroélution utilisé comprend un module M422 (Bio-Rad) alimenté par un PowerPac Basic 100-120/220-240 V (BioRad). Les cupules peuvent ensuite être stockées à 4°C dans du tampon d'éluion contenant 0,05 % de NaN_3 .

5.5. Western-Blot

A l'issue d'une électrophorèse 1D ou 2D, les protéines présentes dans le gel ne sont pas colorées mais sont transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,45 μm (BioRad). Le gel et la membrane sont placés entre six feuilles de papier Whatman 3MM, le tout est préalablement imbibé de tampon de transfert (0,025 M tris, 0,192 M glycine, 20 % méthanol). Le transfert est réalisé grâce à un trans-blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BioRad) au moyen d'un courant électrique (Power Pac 200, BioRad) pendant 30 minutes à 0,4 A. Grâce à l'utilisation de marqueurs de poids moléculaires colorés, la qualité de la migration peut être appréciée. La nitrocellulose est ensuite bloquée deux heures à température ambiante par de la gélatine de poisson 2 % puis rincée trois fois 10 minutes avec le tampon de rinçage (TBS, 0,05 % tween 20) sous agitation à température ambiante. L'anticorps à tester a été mis au contact de toute la surface de la membrane, suivi d'une étape de trois lavages de 10 min. Un anticorps secondaire anti-IgG marqué à la phosphatase alcaline (PAL) spécifique de l'espèce dont provient le premier anticorps a été incubé 1 heure sous agitation à température ambiante, suivie d'une étape de trois lavages de 10 min. La révélation de l'interaction entre les deux IgG est effectuée en ajoutant le substrat de la phosphatase alcaline (NBT/BCIP). La révélation est rapide et est arrêtée par de l'eau. Les membranes de nitrocellulose sont séchées entre deux feuilles de papier buvard pour les conserver.

6. TECHNIQUES D'HYDROLYSE ENZYMATIQUE

6.1. Choix de l'enzyme

L'étude de la littérature a montré que la trypsine était l'enzyme protéolytique la plus employée pour cliver les hormones de croissance en peptides. D'autres enzymes ont été étudiées *in silico* grâce à la fonction *peptidecutter* du site internet expasy (<http://www.expasy.org/cgi-bin/peptidecutter/peptidecutter.pl>).

Les hydrolyses enzymatiques *in silico* ont été effectuées avec différentes enzymes et l'hormone de croissance équine recombinante a été utilisée comme substrat afin de déterminer laquelle des enzymes pouvait produire un peptide N-terminal suffisamment long pour permettre une sensibilité suffisante et être détecté en LC-MS/MS.

6.2. Digestion trypsique en solution

L'hydrolyse enzymatique en solution utilisant la trypsine (EC : 3.4.21.4) a été réalisée en tampon EPAB (EDTA-Pepstatine A-Ammonium Bicarbonate) pH 7,8-7,9 contenant 10 mM d'EDTA, 1 μ M de Pepstatine A et 50 mM de bicarbonate d'ammonium. Les échantillons devant subir la digestion enzymatique ont été repris par 120 μ L d'EPAB et 20 μ L d'acétonitrile avant d'être déposés en insert de vial HPLC ; 10 μ L de trypsine « sequence grade » à 200 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ont été ajoutés et l'hydrolyse enzymatique a été réalisée pendant 15 à 20 heures à 37°C.

6.3. Digestion trypsique « in-gel »

Différentes conditions de digestion « in-gel » ont été testées après une étape d'E2D. Seul le protocole optimisé est décrit ici.

Les spots d'intérêt ont été découpés à l'aide d'un emporte-pièce puis recoupés pour former de petites particules de gel facilitant l'élimination du SDS et du colorant pendant les étapes de lavage mais aussi et surtout pour permettre un accès plus facile à la trypsine. En eppendorf, 200 μ L d'un mélange NH_4HCO_3 25 mM / acétonitrile (50/50) ont été ajoutés aux morceaux de gel. Une agitation mécanique a été réalisée pendant 2 heures à température ambiante. Les 200 μ L ont été éliminés puis l'étape est recommencée jusqu'à l'obtention de morceaux de gel totalement décolorés. La déshydratation des gels a été réalisée avec 100 μ L d'acétonitrile (le gel doit prendre une couleur blanche opaque), puis l'acétonitrile a été éliminé et les gels ont été séchés pendant 10 minutes à température ambiante. Les particules de gel ont été réhydratées avec 10 μ L de trypsine 20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans la glace 15 min. L'excès de trypsine a été éliminé et les particules de gel ont été réhydratées avec 30 μ L de NH_4HCO_3 25 mM. La réaction est réalisée pendant 15 heures à 37 °C et 5 μ L d'acide formique 5% ont été ajoutés pour stopper la réaction. Les Eppendorfs® ont été « secoués » par agitation mécanique pendant 15 min puis centrifugés par un bref pulse. Le liquide surnageant est prélevé et l'étape précédente est recommencée avec un mélange ACN/ acide formique (60/5). Les deux fractions sont regroupées avant d'être évaporées à sec. Les peptides ainsi extraits sont repris dans les conditions initiales de la chromatographie liquide.

7. TECHNIQUES DE MODIFICATION CHIMIQUE DES ACIDES AMINÉS *IN VITRO*

7.1. Oxydation des méthionines

L'oxydation des méthionines en méthionines sulfoxydes du peptide N-terminal tel qu'obtenu après hydrolyse trypsique a été réalisée dans les conditions modifiées de Teh (Teh *et al.*, 1987). Le peptide N-terminal a été dissout en EPAB à une concentration finale de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ et 30 % (m/v) H_2O_2 ont été ajoutés à une concentration de 265 mM. Le mélange réactionnel a été analysé par spectrométrie de masse en injection directe au débit de $8 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ à 2 min puis à 15 min de réaction.

7.2. Désamidation des asparagines

La désamidation de l'asparagine du peptide N-terminal en acide aspartique et isoaspartique a été réalisée dans les conditions modifiées de Karlsson (Karlsson *et al.*, 1999) en laissant le standard correspondant à l'hormone de croissance équine recombinante à 4°C pendant 4 mois dans le tampon EPAB pH 7,9. L'analyse a été réalisée sur les peptides tryptiques en LC-MS/MS.

PARTIE - 3 DÉTECTION DES MARQUEURS SECONDAIRES

1. DOSAGE DES IGF-1 DANS LE PLASMA

La mesure des concentrations en IGF-1 dans le plasma a été réalisée au Laboratoire des Courses Hippiques en suivant la procédure de routine N°: I08/64 utilisant le kit commercial ELISA « Equine IGF-1 » (Biocode). 50 µL de plasma sont prélevés et déposés en Eppendorf® avec 400 µL de solution d'extraction (éthanol/HCl 2 N, 87,5/12,5 %) puis mélangés 5 secondes au vortex. Le mélange est laissé 30 min à température ambiante puis les échantillons sont centrifugés 4 minutes à 4°C à 10000 rpm. 100 µL de surnageant sont prélevés en faisant attention de ne pas troubler la solution et mélangés à 50 µL de solution de neutralisation et 100 µL de solution de dilution dans un tube en polypropylène. 25 µL d'échantillon et de standard sont déposés dans la plaque ainsi que 100 µL de conjugué (Mab de souris anti-IGF-1, marqué PAL). Le mélange est placé sous agitation mécanique pendant 90 min à température ambiante. La plaque est lavée avec le laveur automatique (programme IGF-1/Biocode). 100 µL de substrat (PNPP) sont déposés puis la plaque est incubée 30 min à température ambiante. La réaction est arrêtée par ajout de 100 µL de solution d'arrêt (non communiquée). La mesure des absorbances est réalisée à 405 nm.

2. DOSAGE DU CORTISOL URINAIRE

La mesure des concentrations en cortisol dans l'urine a été réalisée au Laboratoire des Courses Hippiques en suivant la procédure de routine N°: M08/115. 12 mL d'urine sont prélevés et ajustés à pH 9,6 avec une solution d'ammoniaque 8 %. 60 µL d'une solution méthanolique de cortisol-d3 (0,05 mg.mL⁻¹) ainsi que 6 mL d'eau déminéralisée sont ajoutés. Les urines sont extraites sur des cartouches ChemElut CE 1010 (Varian) et le cortisol est élué avec une solution de dichlorométhane contenant 1 % d'éthanol. L'échantillon est évaporé à température ambiante puis repris par 2 x 500 µL de méthanol pour être transféré en vial HPLC. Le vial est ensuite évaporé sous azote à 60°C et repris dans les conditions initiales de la chromatographie (59 % méthanol, 41 % eau MilliQ). Le dosage est réalisé par HPLC/MS (QqQ) en APCI mode positif (TSQ Quantum) avec une chaîne HPLC Surveyor et une colonne nucléosil C18, 100 Å, 150 x 4,6 mm, particules 3 µm.

Tableau II-12 : gradient HPLC utilisé pour le dosage du cortisol urinaire

Temps (min)	Méthanol	Eau MilliQ
0	59	41
10	59	41
11	100	0
13	100	0
14	59	41
24	59	41

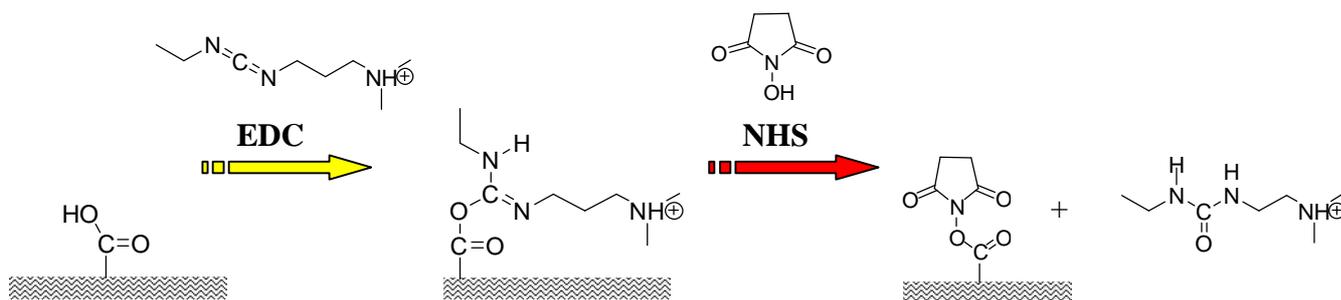


Figure II-10 : activation du carboxyméthyl dextran avec le mélange EDC/NHS

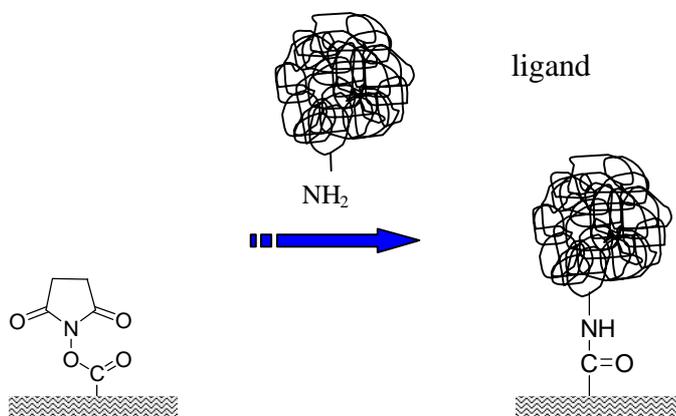


Figure II-11 : couplage amine d'un ligand sur la surface activée de la puce

Le gradient utilisé est présenté dans le Tableau II-12. La quantification est réalisée au moyen d'une gamme d'étalonnage en suivant les ions en mode SIM m/z 363 (cortisol, $M+H^+$) et m/z 366 (cortisol-d3, étalon interne).

3. DÉTECTION DES ANTICORPS ANTI-HORMONE DE CROISSANCE DANS LE PLASMA

3.1. Détection par Résonance Plasmonique de Surface

3.1.1. Préparation de la puce et du récepteur

A un pH supérieur à 3,5, le dextran carboxyméthylé de la surface de la puce est chargé négativement favorisant ainsi la concentration des ligands chargés positivement par attraction électrostatique. Le tampon de couplage fourni est un tampon acétate de sodium 10 mM pH 4,5. Le point isoélectrique de l'hormone de croissance équine recombinante étant de 6,8, cette dernière sera donc chargée positivement et subira l'attraction électrostatique de la puce dont le pK est d'environ 3,5 (forme négative). Les conditions d'immobilisation décrites dans le « Biacore Sensor Surface Handbook » nécessitent une concentration de la molécule à fixer sur la puce de l'ordre de 10 à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; c'est pourquoi, une solution d'hormone de croissance équine recombinante à 1 mg.mL^{-1} en solution tampon HBS-EP pH 7,4 est diluée 20 fois en tampon acétate de sodium 10 mM pH 4,5 pour travailler avec une solution de concentration de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.1.2. Mécanisme de greffage du récepteur sur la puce : couplage amine

La première étape du greffage consiste en l'activation des groupes carboxyles de la surface de la puce par un mélange 0,2 M EDC (1-éthyl 3-(3diméthylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride et 0,05 M NHS (N-hydroxysuccinimide) pour donner un ester de N-hydroxysuccinimide réactif (Figure II-10). Lors de la seconde étape, les esters de N-hydroxysuccinimide réagissent spontanément avec les fonctions amines et les autres groupes nucléophiles des biomolécules passant en contact de la surface activée, permettant ainsi une immobilisation directe de ces molécules (Figure II-11). La plupart des protéines contiennent de nombreux groupements amines ce qui permet d'augmenter la probabilité de fixation du ligand sur la puce. La troisième et dernière étape, utilise une solution d'éthanolamine pour désactiver les groupements esters N-hydroxysuccinimide restés libres à la surface de la puce.

3.1.3. Conditions de greffage de reGH

La puce (CM5) utilisée avec le Biacore® Q contenait 4 microcanaux identiques (FC1 à FC4). Différentes conditions de greffage de l'hormone de croissance équine recombinante ont été testées sur ces microcanaux. Les meilleures conditions retenues correspondaient à : EDC/NHS automix 50 % avec 7 minutes de temps de contact à un débit de $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ puis la solution de reGH à $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a été mise en contact du microcanal pendant 8 minutes à un débit de $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Enfin; la solution d'éthanolamine, permettant de bloquer les sites encore disponibles, a été mise en contact avec le microcanal pendant 7 minutes à un débit de $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.1.4. Mise au point des conditions de régénération de la puce

Une fois que la puce est greffée, c'est-à-dire que l'hormone de croissance équine recombinante est liée de manière covalente à un des canaux de la puce, il est nécessaire de mettre au point les conditions physico-chimiques permettant la dissociation du couple « récepteur-ligand ». Il faut que ces conditions soient suffisamment drastiques pour obtenir le meilleur rendement de dissociation possible sans pour autant faire diminuer la quantité de protéines fixées sur le canal. Ces essais ont été réalisés avec une solution d'anticorps anti-bGH diluée au 1/1000 dans du tampon HBS-EP. Ces anticorps avaient montré une bonne affinité pour l'hormone de croissance équine recombinante lors d'une étude préliminaire. Différentes conditions de régénérations de la puce ont été testées, à savoir 10 mM glycine HCl pH 2 ; 10 mM glycine HCl pH 2,5 ; 10 mM NaOH et 200 mM NaCl et 5 mM NaOH et 400 mM NaCl. Les conditions choisies de régénération de la puce sont 5 mM NaOH et 200 mM NaCl avec 30 μL de la solution de régénération injectés au débit de $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

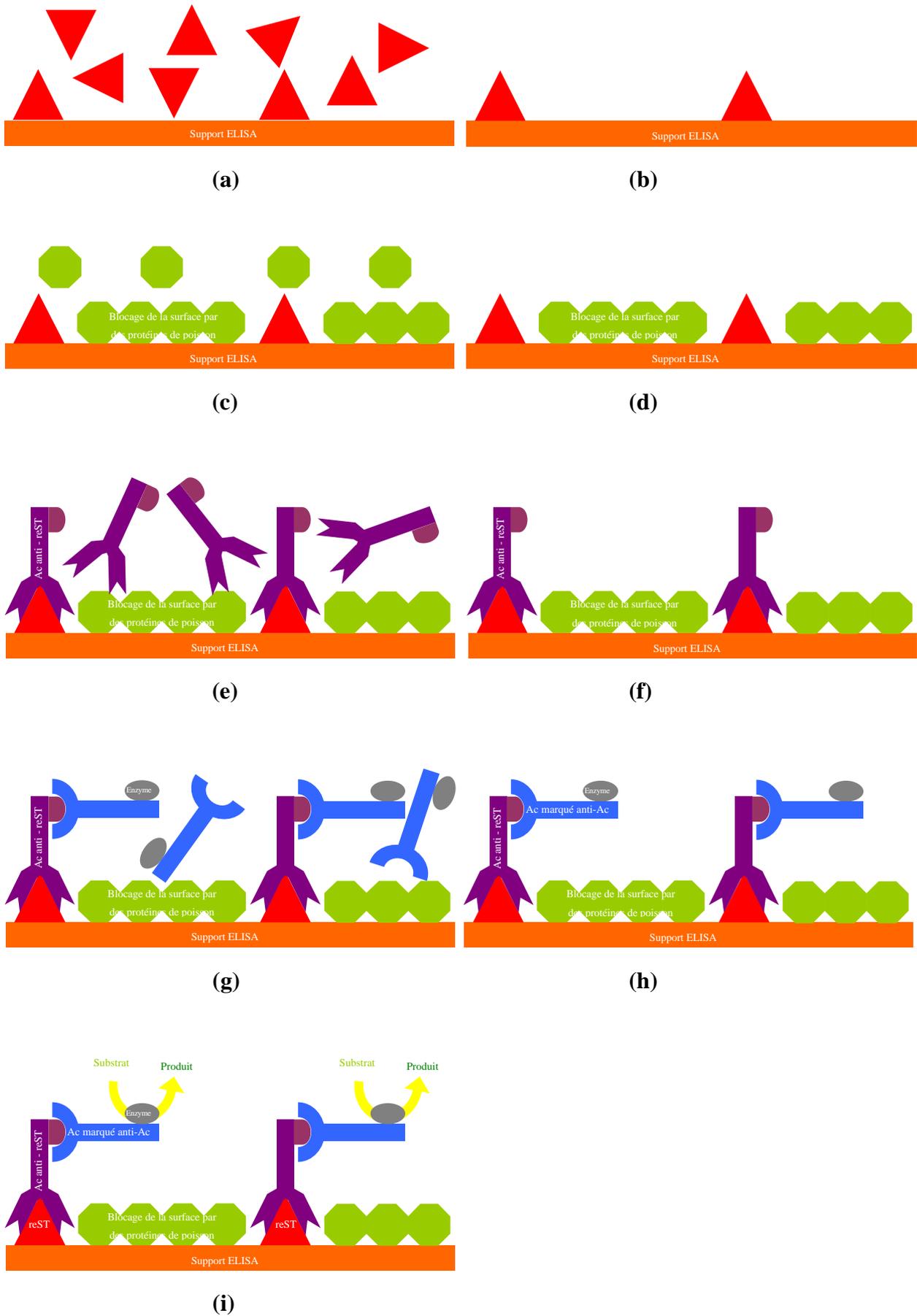


Figure II-12 : description du fonctionnement du test ELISA de détection des anticorps anti-reGH

3.2. Détection par ELISA (Figure II-12)

La composition des tampons de greffage, de lavage, de dilution d'échantillon et chromogène est décrite en annexes.

L'hormone de croissance équine recombinante est préparée à 1 mg.mL^{-1} en **tampon de greffage** et diluée au 1/10. Ensuite, $500 \mu\text{L}$ de cette solution sont dilués dans $9,5 \text{ mL}$ de **tampon de greffage** pour obtenir $[\text{reGH}] = 5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. $100 \mu\text{L}$ sont délivrés dans chaque cupule pour obtenir une quantité de protéines à 500 ng/puit (**a**). Le type de plaque choisi pour réaliser le test ELISA est F16 Maxisorp loose (NUNC). La plaque est incubée couverte toute la nuit à $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Le lendemain, le matériel et la plaque sont sortis au préalable au moins 20 minutes à température ambiante pour limiter les effets de bord. La plaque est lavée trois fois en **tampon de lavage**, $300 \mu\text{L}$ par cupule (**b**). Le blocage des sites non spécifiques se fait en SeaBlock dilution au 1/50° (v/v) dans du **tampon de dilution**. $100 \mu\text{L}$ sont déposés dans chaque cupule. Laisser incuber 1h à 37°C (**c**). La plaque est ensuite lavée trois fois en **tampon de lavage**, $300 \mu\text{L}$ par cupule (**d**). L'échantillon est dilué au 1/100 avec du **tampon de dilution**. $100 \mu\text{L}$ par puits sont déposés incubés 1h30 à 37°C (**e**). La plaque est ensuite lavée trois fois en **tampon de lavage**, $300 \mu\text{L}$ par cupule (**f**). L'anticorps secondaire marqué est reconstitué avec 2 mL d'eau MilliQ puis homogénéisé et stocké à $4 \text{ }^\circ\text{C}$. $100 \mu\text{L}$ par puits d'une dilution au 1/8000 en PBS sont déposés et la plaque est incubée 1h à 37°C (**g**). La plaque est lavée trois fois en **tampon de lavage**, $300 \mu\text{L}$ par cupule (**h**). Pour une plaque, 10 mL de **tampon chromogène** [Phosphate/Citrate/ABTS] sont décongelés, puis $10 \mu\text{L}$ de H_2O_2 30% sont ajoutés extemporanément. $100 \mu\text{L}$ du mélange sont déposés dans chaque puits et la réaction se développe pendant 80 min à 37°C . La plaque est lue à une absorbance de 405 nm (**i**).

PARTIE - 4 MÉTHODES DE DÉTECTION DIRECTE DE L'HORMONE DE CROISSANCE

1. DOSAGE PAR RIA

Le dosage par RIA de l'hormone de croissance équine recombinante dans les échantillons de plasma a été pratiqué par le Dr Guillaume de l'INRA de Tours-Nouzilly, unité de recherche de Physiologie de la Reproduction et des Comportements (PRC). Il n'a pas été possible d'obtenir le protocole détaillé du dosage, cependant, les étapes du principe nous ont été communiquées.

Le dosage réalisé est un dosage RIA homologue (eGH ou reGH + **Ac anti-reGH** + eGH*). Ce procédé de dosage est basé sur une technique de compétition. Les échantillons et les étalons sont incubés avec de l'eGH*, marquée par de l'iode¹²⁵ et un anticorps anti-reGH. Pendant l'incubation, il y a compétition, entre l'hormone marquée et celle à doser, vis-à-vis de l'anticorps. Après l'incubation, la séparation de l'hormone marquée libre de celle liée à l'anticorps se fait au moyen d'un second anticorps, spécifique du premier, qui précipite avec lui grâce au polyéthylène glycol (PEG, favorisant l'attraction moléculaire), entraînant l'hormone fixée. La centrifugation permet d'obtenir un meilleur culot, assurant une meilleure qualité de dosage. Le surnageant contenant l'excès d'hormone marquée est ensuite éliminé. La radioactivité du précipité est mesurée dans un compteur de rayons gamma. Le taux de radioactivité lié à l'anticorps est inversement proportionnel à la concentration de l'échantillon. Les conditions de température et de temps d'incubation peuvent faire varier l'équilibre de la réaction « antigène-anticorps », aussi une courbe d'étalonnage est réalisée avec des étalons de concentrations connues. Les valeurs des échantillons à déterminer sont reportées sur la courbe standard, établie dans les mêmes conditions de réaction. On déduit sur l'abscisse la concentration de l'hormone dans le milieu biologique.

Tableau II-13 : composition du gradient d'élution utilisé avec la colonne Interchim (C₄, 2 x 250 mm, 300 Å, 5 µm) pour la caractérisation par spectrométrie de masse du peptide N-terminal caractéristique de reGH

Temps (min)	Débit (mL.min ⁻¹)	H ₂ O, 0,2 % AF (%)	ACN, 0,2 % AF (%)
0	0,300	70	30
5		50	50
12		40	60
17		0	100
22		0	100
27		70	30
35		70	30

Tableau II-14 : conditions de désorption-ionisation des peptides N-terminaux de GH (LCQ DECA)

Débit de gaz "gaine" de séchage	45 ua
Débit de gaz auxiliaire	0
Tension source	4,50 kV
Température du capillaire chauffé	206 °C
Tension capillaire	28 V
Tension lentille de focalisation	-60 V

Tableau II-15 : conditions de désorption-ionisation des peptides N-terminaux de GH (Quattro)

Tension souce	3 kV
Tension cone	40 V
Tension extracteur	3 V
Tension lentille de focalisation	0,15 V
Température du bloc source	120 °C
Température de désolvatation	300 °C

Tableau II-16 : conditions de désorption-ionisation des peptides N-terminaux de GH (LTQ XL)

Paramètres	Mis au point	M. Eric Génin (Thermo Scientific)
Tension souce	4,9 kV	4,5 kV
Température du capillaire chauffé	270°C	350°C
Tension lentille de focalisation	160 V	80 V
Voltage capillaire	49 V	24 V
Débit de gaz gaine (Sheath)	45 ua	50 ua
Débit de gaz auxiliaire (Aux.)	10 ua	10 ua
Débit de gaz rideau (Sweep)	0	10 ua

Tableau II-17 : conditions de désorption-ionisation des peptides N-terminaux de GH (TSQ Quantum Ultra)

Paramètres	M. Eric Génin (Thermo Scientific)
Tension souce	4 kV
Température du capillaire chauffé	350°C
Débit de gaz gaine (Sheath)	95 ua
Débit de gaz auxiliaire (Aux.)	5 ua
Débit de gaz rideau (Sweep)	15 ua

ua : unité arbitraire

2. DÉTECTION DE reGH PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE

2.1. Injection directe

Les infusions de peptides et d'hormones de croissance entières ont été réalisées à la concentration de $10 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ dans un mélange 50/50 eau/méthanol 0,1 % acide formique à un débit de $8 \mu\text{L.min}^{-1}$.

2.2. Conditions HPLC

La colonne chromatographique utilisée est une MODULO-CART QK UPTISPHERE [code : UP5WC4#25QK] commercialisée par la société Interchim (Montluçon, France) dont les caractéristiques sont : phase C₄, diamètre interne 2 mm, longueur 250 mm, porosité 300 Å et diamètre des particules 5 µm. Le Tableau II-13 représente la composition du gradient d'élution choisi. Tous les solvants sont de la pureté requise pour réaliser de l'HPLC. L'eau Milli Q est contrôlée par mesure directe de sa conductivité sur l'appareil. La valeur doit être de l'ordre de 18 MO.cm. Après extraction, concentration et reprise de l'échantillon avec un mélange de solvants correspondant aux conditions initiales de la chromatographie, 20 µL sont injectés.

2.3. Conditions de réglage de la désorption-ionisation des peptides N-terminaux des GH

Pendant ce travail de thèse, différents spectromètres de masse ont été utilisés en mode electrospray positif (ESI +). Un LCQ Déca équipé d'un piège à ions 3D (Thermo Scientific), un Quattro avec un triple quadripôle (Waters), un LTQ XL comprenant un piège à ions linéaire (Thermo Scientific) et un TSQ Quantum Ultra avec un triple quadripôle (Thermo Scientific). Les conditions d'ionisation utilisées avec chaque appareil sont présentées respectivement dans le Tableau II-14, le Tableau II-15, le Tableau II-16 et le Tableau II-17.

Tableau II-18 : paramètres de détection des ions appliqués aux peptides N-terminaux reGH, eGH et rbGH en mode « balayage des ions produits », en mode « selected reaction monitoring » (SRM), en mode « consecutive reaction monitoring » (CRM) obtenus avec le piège à ions linéaire (LTQ XL)

	Peptides	[M+2H] ²⁺ (m/z)	Energie de collision (%)	Qz	Temps d'accumulation des ions (ms)	Fenêtre d'isolement (m/z)	Fenêtre de balayage (m/z)	Ions fils recherchés (m/z)
Balayage des ions produits	N-terminal reGH	933,5	20	0,260	45	3	500 à 1500	578 794 795 1287,5 1288,5
	N-terminal eGH	868						447 1287,5 1288,5
	N-terminal rbGH	913	18				600 à 1600	643 774 774,5 790 960 1047,5 1247,5
SRM	N-terminal reGH	933,5	25	0,260	45	3	578 à 579	578,3
							794 à 795	794,4
							1287 à 1290	1287,5 1288,5 1289,5
CRM	N-terminal reGH	933,5	25	0,260	45	3	794,5	
		794,5	13	0,250	40		1287 à 1290	1287,5 1288,5 1289,5
Balayage des ions produits M. Eric Génin (Thermo)	N-terminal reGH	933,4	16	0,250	30	3	500 à 1500	578 794 795 1287,5 1288,5

2.4. Paramètres de fragmentation MS/MS du peptide N-terminal reGH

Les fragmentations du peptide N-terminal caractéristique de l'hormone de croissance équine recombinante ainsi que celles des peptides N-terminaux endogène et recombinant bovin ont été étudiées avec un piège à ions linéaire (LTQ XL) et avec un triple quadripôle (TSQ Quantum Ultra).

2.4.1. MS/MS en utilisant un piège à ions linéaire (LTQ XL)

L'analyse de la fragmentation des peptides N-terminaux dichargés ($[M+2H^{2+}]$) de reGH (m/z 933,5), eGH (m/z 868) et rbGH (m/z 913) en mode « balayage des ions produits », en mode « selected reaction monitoring » (SRM) et « consecutive reaction monitoring » (CRM) a permis de définir les paramètres du piège à ions linéaire les plus sensibles et spécifiques pour la détection des analytes d'intérêt dans le plasma. Le Tableau II-18 présente les différentes conditions mises au point au cours de ce travail ainsi que celles obtenues lors des essais LTQ-Orbitrap[®] réalisés chez Thermo Scientific (Les Ulis, France) par M. Eric Génin.

2.4.2. MS/MS en utilisant un triple quadripôle (TSQ Quantum Ultra)

Les paramètres de fragmentation du peptide N-terminal reGH dichargé mis au point lors d'essais d'obtention de nouvelles limites de détection ont été : MS/MS de l'ion de m/z 933,4 avec une énergie de collision de 28 % se fragmente en ions m/z 794,3, m/z 1287,9, m/z 1288,9 avec une fenêtre de détection pour chacun des ions fils de 0,10 et un temps de balayage de 0,1 seconde.

CHAPITRE - III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Comme présenté dans le chapitre I, les hormones de croissance sont suspectées d'être utilisées pour accroître la production de lait des vaches laitières, comme promoteur de croissance en production animale (bovins, porcins) et pour améliorer les performances des chevaux de course. La législation interdisant leur utilisation en Europe, le premier objectif de ce travail a consisté à réaliser avec les échantillons d'expérimentations animales (chevaux pur-sang) le suivi de marqueurs secondaires (dépistage) de l'administration de l'hormone de croissance recombinante tels que l'IGF-1 ou les anticorps anti-reGH. Les résultats relatifs à ce travail seront présentés dans la première partie de ce chapitre.

L'autre partie du travail a consisté à mettre au point un protocole de purification de reGH dans le plasma pour pouvoir disposer d'une méthode suffisamment sensible et spécifique pour permettre de discriminer les deux molécules dont la concentration physiologique de la forme endogène est comprise entre 1 et 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (confirmation). Le travail de caractérisation des standards, les différentes approches étudiées pour élaborer le protocole de purification sont présentées dans la seconde partie de ce chapitre ainsi que la validation de la méthode.

PARTIE - 1 MÉTHODES DE DÉPISTAGE DE L'UTILISATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE

1. LES IGF-1

Lorsque l'hormone de croissance est administrée, celle-ci agit directement sur le foie des animaux, l'un de ses tissus cibles. En réponse à cette stimulation, l'organe va libérer dans le sang de l'IGF-1. Lors d'un traitement à la GH, le taux d'IGF-1 circulant en est donc augmenté. En conséquence, un dosage ELISA de la concentration en IGF-1 dans les échantillons d'expérimentations 497 et 498 a été entrepris afin de suivre l'évolution de la concentration en IGF-1 plasmatique après administration d'EquiGen-5[®] à ces chevaux.

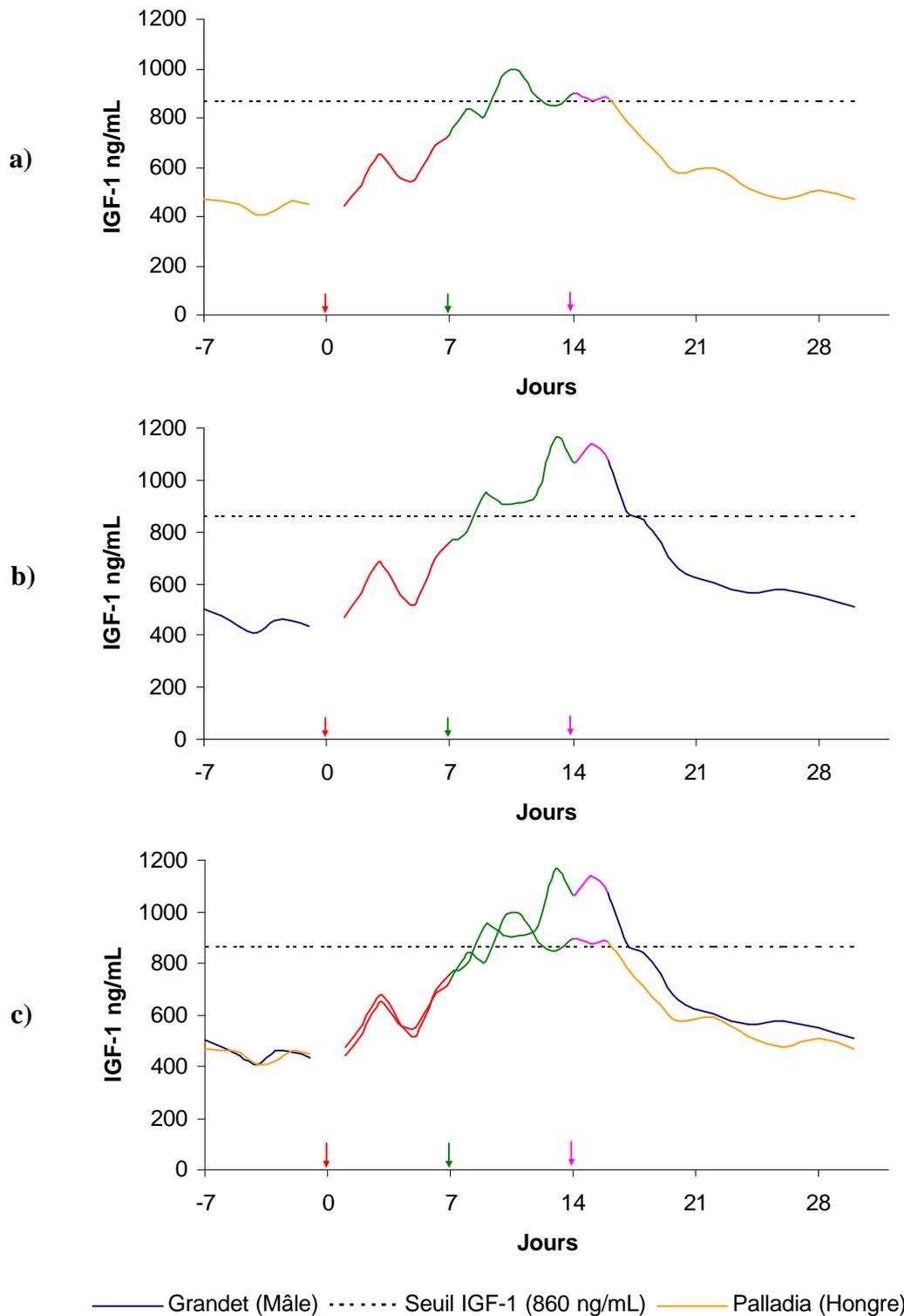


Figure III-1 : concentrations en IGF-1 plasmatiques déterminées par ELISA, J₇ à J₊₃₀ cheval 497 (a), cheval 498 (b) et superposition des deux courbes obtenues (c). Les flèches de couleur désignent les posologies d'EquiGen-5[®] administrées, rouge (18 µg/kg), vert (28 µg/kg) et rose (30 µg/kg). Le trait en pointillé représente le seuil en IGF-1 proposé à 860 ng.mL⁻¹.

1.1. Dosage des IGF-1

La Figure III-1 représente les concentrations en IGF-1 plasmatique obtenues de J₋₇ à J₊₃₀ par ELISA pour les chevaux Palladia (497) et Grandet (498). La courbe de concentration en IGF-1 plasmatique obtenue pour le cheval 497 montre une augmentation progressive mais non régulière de cette concentration avec des valeurs de concentration en IGF-1, avant administration, homogènes et comprises entre 410 et 468 ng.mL⁻¹. Une augmentation par à-coups est observée dès le début du traitement à l'EquiGen-5[®] pour atteindre un maximum en J₊₁₁ de 987 ng.mL⁻¹. Puis, un retour progressif à un taux d'IGF-1 plasmatique basal en J₊₃₀ de 470 ng.mL⁻¹ est atteint.

La courbe de concentration en IGF-1 plasmatique obtenue pour le cheval 498 indique une augmentation progressive non régulière de cette concentration avec des valeurs de concentration en IGF-1, avant administration, homogènes et comprises entre 409 et 503 ng.mL⁻¹. La différence de 94 ng.mL⁻¹ entre ces deux concentrations est jugée non significative en comparaison avec les données bibliographiques et correspond à une variabilité naturelle chez l'animal (de Kock *et al.*, 2000). Le pic de concentration en IGF-1 le plus important est observé en J₊₁₃ (1167 ng.mL⁻¹) avec un épaulement important en J₊₁₅ (1140 ng.mL⁻¹). Puis, un retour progressif à un taux d'IGF-1 plasmatique basal en J₊₃₀ de 511 ng.mL⁻¹ est atteint.

Les informations fournies par la superposition des profils des courbes de concentration en IGF-1 plasmatique montrent qu'elles sont relativement similaires. Après la première injection, une augmentation progressive et identique de la concentration en IGF-1 jusqu'en J₊₈ est observée pour diverger ensuite jusqu'en J₊₁₈ où dans cette zone, un écart maximal de 320 ng.mL⁻¹ est relevé à J₊₁₃ entre les deux courbes représentant certainement la variabilité inter-individus. Pour les deux animaux, des valeurs maximales supérieures au seuil de 860 ng.mL⁻¹ pendant le traitement (Grandet : J₊₉ à J₊₁₇, Palladia : J₊₁₀ à J₊₁₆) et le retour à des valeurs basales comprises entre 400 et 500 ng.mL⁻¹ sont observées. Ces résultats démontrent que la reGH a eu un impact sur la physiologie des chevaux en augmentant la concentration en IGF-1 et que le dépistage de l'administration de reGH est possible 9 à 10 jours après le début du traitement et ce pendant cinq jours, en se basant sur le seuil de décision proposé à 860 ng.mL⁻¹ dans le plasma.

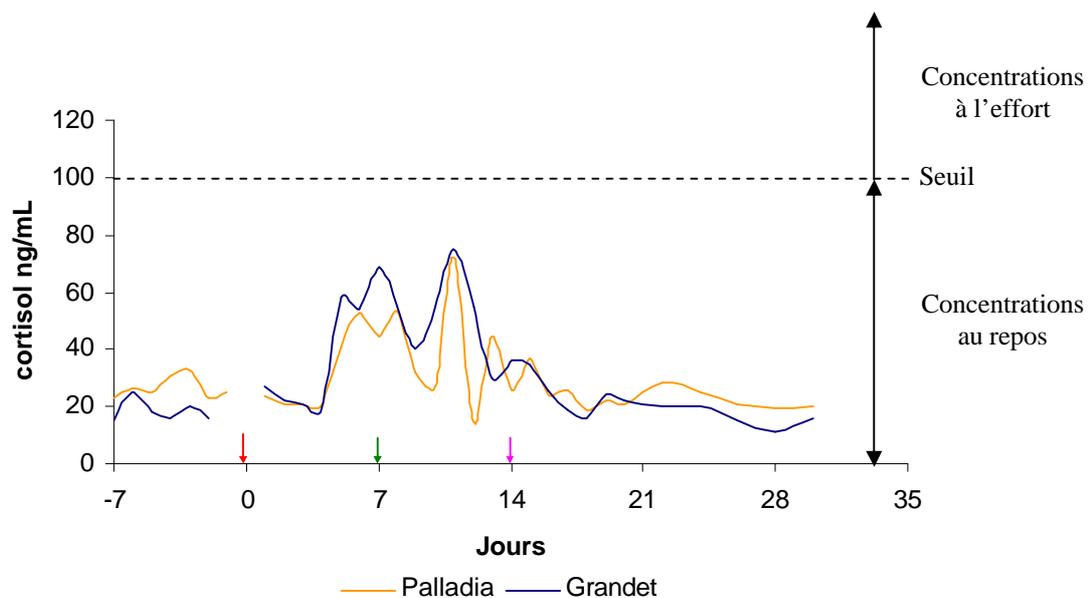


Figure III-2 : superposition des courbes de dosage du cortisol urinaire obtenues par LC/MS pour les deux chevaux (J.₇ à J.₊₃₀). Les flèches de couleur désignent les posologies d'EquiGen-5 administrées, rouge (18 µg/kg), vert (25 µg/kg) et rose (30 µg/kg).

1.2. Justification des concentrations IGF-1 au repos

Le vétérinaire chargé de l'expérimentation animale ayant noté que de nombreux prélèvements avaient été réalisés après un exercice, où le terme « exercice » n'exprime néanmoins pas la notion d'effort important ; il a été envisagé de réaliser un dosage du cortisol urinaire pour mettre en évidence un effort prononcé ou non avant les prélèvements sanguins des chevaux 497 et 498. Un effort violent aurait eu pour conséquence une augmentation de la concentration en IGF-1, en effet, la concentration en IGF-1 plasmatique est plus élevée à l'effort qu'au repos. Au repos, la concentration du cortisol urinaire du cheval adulte (pur-sang et autres) ne doit pas dépasser 100 ng.mL^{-1} tandis qu'à l'effort, elle peut atteindre près de 300 ng.mL^{-1} (Toutain *et al.*, 1995). La Figure III-2 présente la superposition des courbes de concentration en cortisol urinaire des chevaux Palladia (497) et Grandet (498) obtenues à l'aide d'un dosage par LC/MS de J_{.7} à J₊₃₀.

Les concentrations en cortisol urinaire obtenues pour l'ensemble des échantillons sont inférieures à 100 ng.mL^{-1} avant, pendant ainsi qu'après l'arrêt du traitement à l'hormone de croissance équine recombinante. Toutefois, il apparaît un effet de perturbation des concentrations en cortisol urinaire de J₊₃ à J₊₁₆ pour les deux chevaux. En effet, pour ces deux animaux, les concentrations de cortisol avant traitement et jusqu'à J₊₃ sont en moyenne de 25 ng.mL^{-1} puis elles augmentent entre 60 et 80 ng.mL^{-1} pour revenir après J₊₁₆ à une valeur basale de 25 ng.mL^{-1} . L'écart de près de 50 ng.mL^{-1} observé entre les concentrations initiales et finales de cortisol avec celles mesurées entre J₊₃ et J₊₁₆ est probablement imputable à un effet métabolique de l'administration de l'hormone de croissance. Aucune information bibliographique ne relate néanmoins d'interconnexions métaboliques entre le cortisol et l'hormone de croissance qui pourrait expliquer cette fluctuation.

En conclusion :

L'évolution des concentrations en IGF-1 plasmatique, biomarqueur secondaire de l'administration de l'hormone de croissance, observée pendant l'expérimentation des chevaux 497 (Palladia, hongre) et 498 (Grandet, entier) est en accord avec les valeurs précédemment mesurées au Laboratoire des Courses Hippiques et rapportées dans la littérature (Noble et Sillence, 2000 ; Popot *et al.*, 2000 ; Price *et al.*, 2000 ; Popot *et al.*, 2001b). Il a ainsi été observé, pendant quelques jours après le début du traitement, un passage des concentrations en IGF-1 plasmatique au dessus du seuil de suspicion communément accepté de 860 ng.mL^{-1} (Popot *et al.*, 2002).

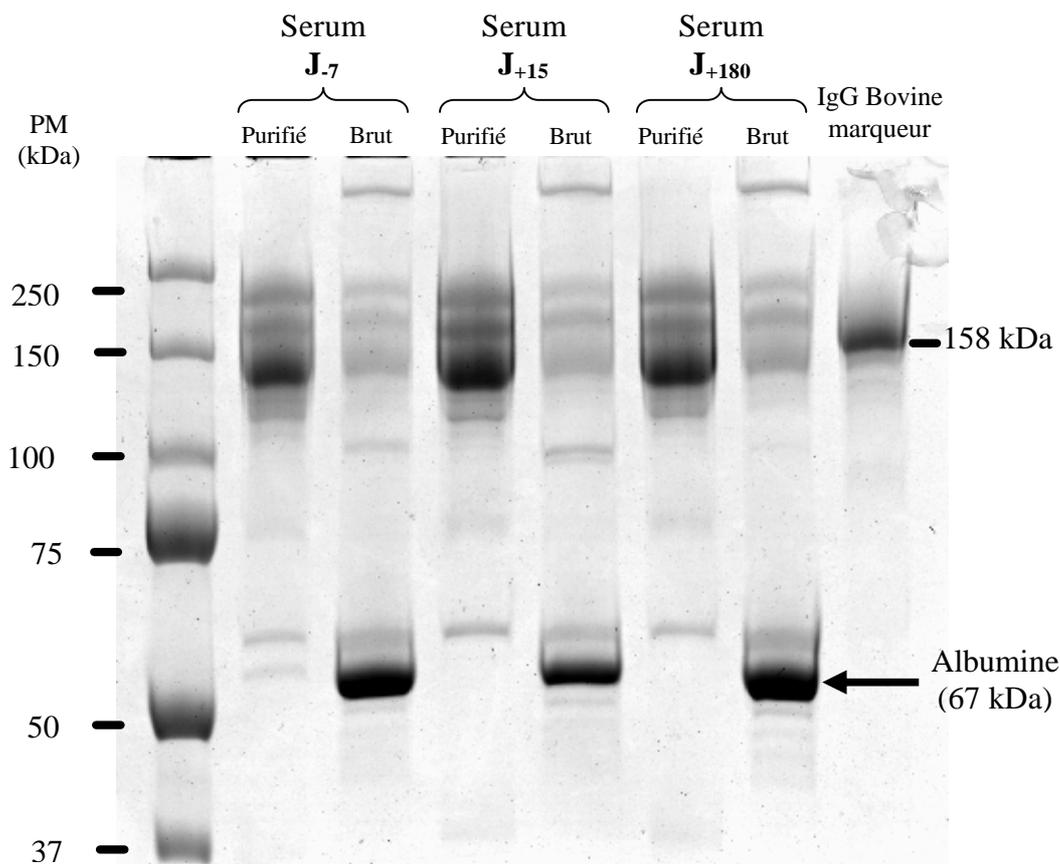


Figure III-3 : SDS-PAGE représentant l'abondance de protéines dans le sérum purifié à l'acide caprylique et le sérum total (cheval 498). 14 μg de protéines de chacun des échantillons (J-7, J+15, J+180) ont été séparés par électrophorèse dans un gel d'acrylamide 6 % en condition non réductrice. Gel coloré au bleu de Coomassie

Tableau III-1: concentrations en protéines dans le plasma et le sérum avant et après la précipitation des protéines à l'acide caprylique obtenues par dosage protéique selon la méthode de Folin-Lowry. Chaque échantillon a été quantifié quatre fois.

Cheval	Matrice	Jours.	Concentration en protéines (g.L^{-1})		Rendement d'élimination (%)
			Avant précipitation	Après précipitation	
H497	Serum	J-7	$74,9 \pm 0,5$	$19,9 \pm 0,2$	73
		J+15	$79,1 \pm 2,4$	$23,5 \pm 0,6$	70
		J+180	$78,4 \pm 2,0$	$22,4 \pm 0,1$	71
	Plasma	J-7	$80,5 \pm 1,7$	$20,2 \pm 0,1$	75
		J+15	$88,3 \pm 1,5$	$21,9 \pm 0,3$	75
		J-7	$81,6 \pm 3,9$	$24,6 \pm 0,5$	70
H498	Serum	J+15	$93,6 \pm 0,7$	$27,8 \pm 0,5$	70
		J+180	$82,3 \pm 0,7$	$25,5 \pm 0,7$	69
		J-7	$85,8 \pm 0,6$	$25,8 \pm 0,6$	70
	Plasma	J+15	$95,6 \pm 1,5$	$29,9 \pm 0,5$	69

Dans le cas présent, les animaux ayant été traités avec l'EquiGen-5[®] sont détectés suspects après 9 jours de traitement, et ce pendant 9 jours pour Grandet et après 10 jours pendant 7 jours pour Palladia. L'augmentation des concentrations en IGF-1, suivie d'un retour à des concentrations basales après l'arrêt du traitement, implique que la molécule de reGH administrée a eu un effet physiologique sur les chevaux. Effet médié par l'IGF-1. Les fluctuations de concentrations en IGF-1 plasmatique observées ne peuvent pas être imputées à un effort trop important des chevaux car tous les échantillons urinaires ont montré une concentration en cortisol inférieure à 100 ng.mL⁻¹. Par conséquent les concentrations en IGF-1 sont toutes à considérer comme des valeurs au repos. **Le dosage des IGF-1 a donc permis le dépistage de l'administration de reGH pendant le traitement à l'EquiGen-5[®].**

2. ANTICORPS ANTI-reGH

L'étude de l'apparition des anticorps anti-reGH chez les chevaux consécutivement à l'administration prolongée d'EquiGen-5[®] a été menée par 3 techniques différentes. La première, par la technique du Western-Blot, la seconde, par Résonance plasmonique de Surface (RPS) au moyen d'un Biacore[®] Q et enfin par un test ELISA mis au point au cours de cette thèse.

2.1. Purification d'anticorps à l'acide caprylique

L'efficacité de la purification des IgGs à l'acide caprylique a été évaluée en comparant les bandes de migration obtenues par SDS-PAGE de 14 µg de sérum total et sérum purifié à l'acide caprylique des jours J₋₇, J₊₁₅, J₊₁₈₀ (cheval 498). Les résultats Figure III-3 démontrent l'élimination de protéines majoritaires du plasma. Dans tous les serums bruts, l'albumine est présente à la masse moléculaire attendue de 67 kDa alors qu'elle est éliminée dans tous les échantillons purifiés. L'élimination de l'une des protéines la plus abondante du sérum (40 %) est ainsi assurée par cette technique de précipitation. L'analyse électrophorétique des 3 extraits purifiés montre une bande majoritaire comprise entre 130-150 kDa qui est en accord avec des résultats antérieurs indiquant que les IgGs de chevaux ont une masse moléculaire autour de 150 kDa (Raweerith et Ratanabanangkoon, 2003 ; Herrera *et al.*, 2005). La localisation identique dans le gel du marqueur IgG bovin (158 kDa) fournit une information complémentaire qui permet de confirmer la présence d'IgGs de chevaux à 150 kDa. Dans ce travail, l'abondance de chacun des isotopes n'a pas été évaluée. Une étude complémentaire a été réalisée pour analyser les concentrations en protéine par la méthode de Lowry dans les échantillons de plasma et sérum collectés sur les deux chevaux (497, 498) à J₋₇, J₊₁₅ et J₊₁₈₀ (sérum uniquement) (Tableau III-1).

Comme attendu, lié à la présence de fibrine dans les échantillons, les concentrations en protéines plasmatiques sont supérieures à celles des échantillons sériques. La comparaison entre la concentration en protéines totales avant et après la précipitation à l'acide caprylique montre donc une importante élimination des protéines contenues dans les matrices. Dans tous les échantillons analysés, plus de 70 % des protéines totales ont été éliminés par la précipitation à l'acide caprylique où parmi ces 70 % de protéines figure majoritairement l'albumine. Ces résultats de dosage confirment ceux précédemment obtenus par électrophorèse.

L'utilisation de l'acide caprylique pour purifier des IgGs à partir du sérum de différents mammifères a déjà été décrite dans la littérature (Steinbuch et Audran, 1969 ; McKinney et Parkinson, 1987). Les conditions de précipitation à l'acide caprylique ont été majoritairement décrites pour l'obtention de sérum antivenimeux à partir de chevaux hyperimmunisés et adaptées dans ce travail (Rojas *et al.*, 1994 ; Raweerith et Ratanabanangkoon, 2003 ; Herrera *et al.*, 2005).

En conclusion :

Selon les modifications apportées au protocole de Rojas (Rojas *et al.*, 1994), les IgGs équine ont été purifiées. L'efficacité de la précipitation à l'acide caprylique pour purifier les IgGs a été évaluée au moyen de l'électrophorèse SDS-PAGE et de la quantification des protéines totales. La précipitation à l'acide caprylique des plasmas ou des sérums conduit à une élimination de près de 70 % des protéines non désirées parmi lesquelles figure majoritairement l'albumine. Il semble que cette technique de précipitation puisse permettre d'augmenter considérablement la sensibilité de détection des anticorps anti-reGH si ils sont présents dans l'échantillon par augmentation du rapport signal sur bruit lors de leur détection.

2.2. Mise en évidence d'anticorps anti-reGH par Western-Blot

La production d'anticorps consécutive à l'administration de reGH à des chevaux a été évaluée en utilisant la technique du Western-Blot. Cette technique permet de visualiser au moyen d'une réaction enzymatique colorée l'interaction existante entre une molécule à détecter et des anticorps spécifiques. Les échantillons de sérum collectés à J₋₂, J₋₁, J₊₂₀, J₊₂₂, J₊₁₃₅ (cheval 497) et J₊₂₀, J₊₂₂, J₊₁₃₅ (cheval 498) ont été analysés par cette technique comme précédemment décrit par Pinel (Pinel *et al.*, 2005). La reGH contenue dans la préparation commerciale d'EquiGen-5[®] ainsi que les marqueurs de poids moléculaire colorés ont subi une électrophorèse SDS-PAGE. L'électrophorégramme non révélé a été transféré sur une membrane de nitrocellulose sur laquelle les IgGs précédemment purifiés à l'acide caprylique ont été mis en contact.

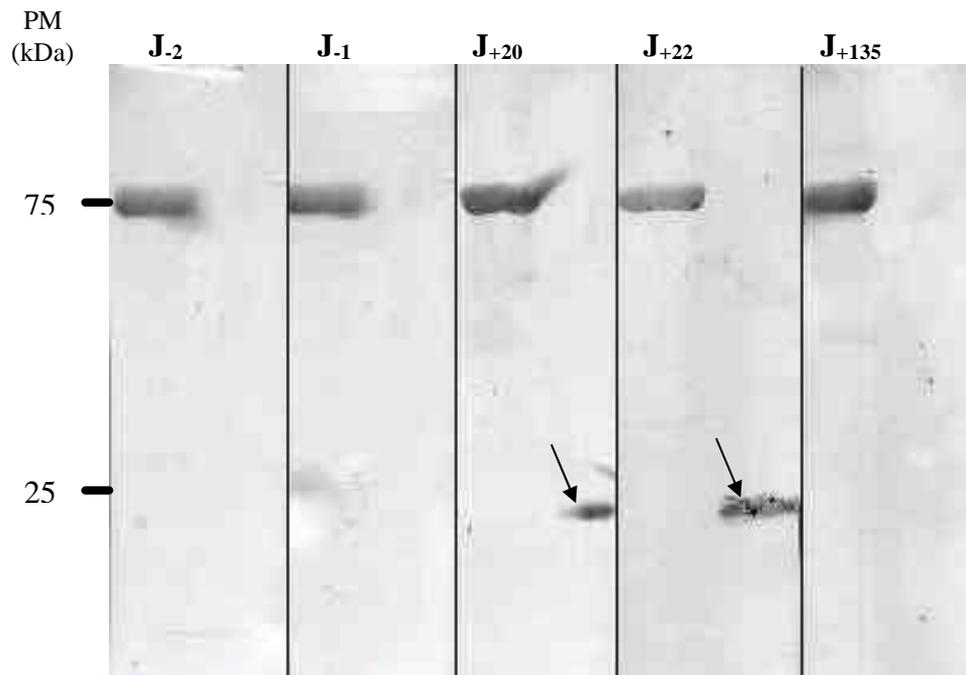


Figure III-4 : recherche d'anticorps anti-reGH par Western-Blot (Palladia). Révélation réalisée à l'aide d'anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) de chevaux, marqués à la phosphatase alcaline, substrat NBT/BCIP

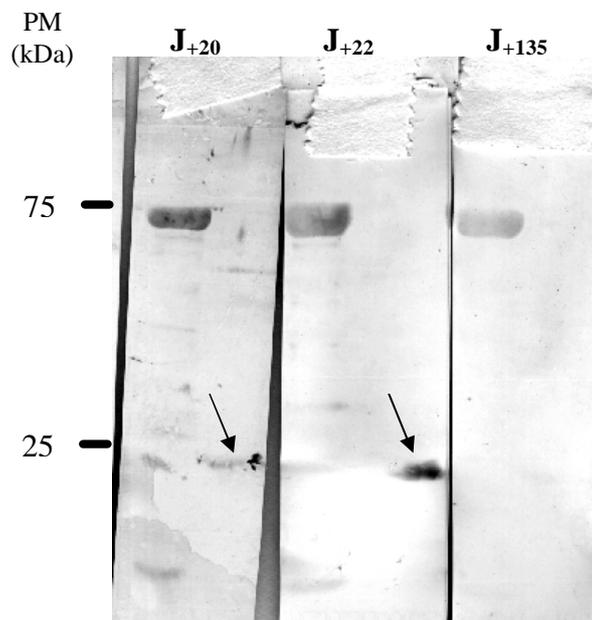


Figure III-5 : recherche d'anticorps anti-reGH par Western-Blot (Grandet). Révélation réalisée à l'aide d'anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) de chevaux, marqués à la phosphatase alcaline, substrat NBT/BCIP

Ensuite, les étapes immunologiques classiques du Western-Blot ont été pratiquées. Les Figure III-4 et Figure III-5 sont des images obtenues après révélation des échantillons de sérum provenant respectivement des chevaux 497 et 498. Il apparaît (Figure III-4) que des anticorps anti-reGH sont détectés uniquement en J_{+20} et J_{+22} et qu'ils ne sont ni détectés avant traitement (J_{-2} et J_{-1}), ni au bout de 135 jours après le début de l'expérimentation. Les résultats obtenus pour le cheval 498 (Figure III-5) confirment les résultats précédents car il est détecté des anticorps anti-reGH uniquement en J_{+20} et J_{+22} , aucune présence d'anticorps n'est décelable au bout de 135 jours.

Ces résultats démontrent la production d'anticorps à l'encontre de l'hormone de croissance équine recombinante dans le sérum des animaux traités et confirment de surcroît que les anticorps ne sont pas dirigés contre des impuretés ou de l'excipient présent dans la solution injectable d'EquiGen-5[®]. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus chez la vache laitière où des anticorps anti-rbGH ont pu être détectés par cette technique 28 jours après le début de la première administration de rbGH (Pinel *et al.*, 2005). Les anticorps peuvent ici être détectés 20 jours après la première injection de reGH aux chevaux tandis qu'une fenêtre de détection de 40 jours avait été obtenue par une technique RIA quand de l'hGH ou de la rbGH avaient été administrés aux chevaux (Bonnaire *et al.*, 1998).

En conclusion :

Bien que la méthode du Western-Blot soit longue à mettre en oeuvre car elle nécessite la réalisation de gel d'acrylamide, la migration des échantillons, leur transfert sur une membrane de nitrocellulose ainsi que des étapes immunologiques délicates de révélation; il s'avère qu'elle permet facilement la caractérisation d'anticorps anti-reGH dans des échantillons sériques d'animaux traités par reGH et purifiés à l'acide caprylique. D'autre part, l'électrophorèse étant réalisée en condition dénaturante pour la protéine reGH (SDS et β -mercaptoéthanol), celle-ci a donc perdu sa structure tridimensionnelle native. Par conséquent, les épitopes reconnus par les anticorps sont majoritairement des épitopes continus liés à la séquence de la protéine et non des épitopes discontinus natifs.

Le développement d'une technique « haut débit » plus appropriée semble indispensable pour pouvoir détecter simultanément la présence d'anticorps anti-reGH dans un plus grand nombre d'échantillons et tenter d'augmenter la sensibilité de détection. Dans ce contexte, les technologies SPR-BIA et ELISA ont donc été envisagées.

Tableau III-2: résultats du travail de mise au point correspondant aux conditions d'immobilisation de reGH sur une puce de type CM5 ainsi que les conditions de régénération de l'interaction anticorps-reGH élaborées

Type d'injection	Conditions utilisées
EDC/NHS	Auto mix 50% Temps de contact : 7 min Débit : 10 μ L/min
reST (50 μ g/mL)	Temps de contact : 8 min Débit : 10 μ L/min
Ethanolamine	Temps de contact : 7 min Débit : 10 μ L/min
Dilution de l'échantillon	1/10
Conditions de régénération	5 mM NaOH, 200 mM NaCl

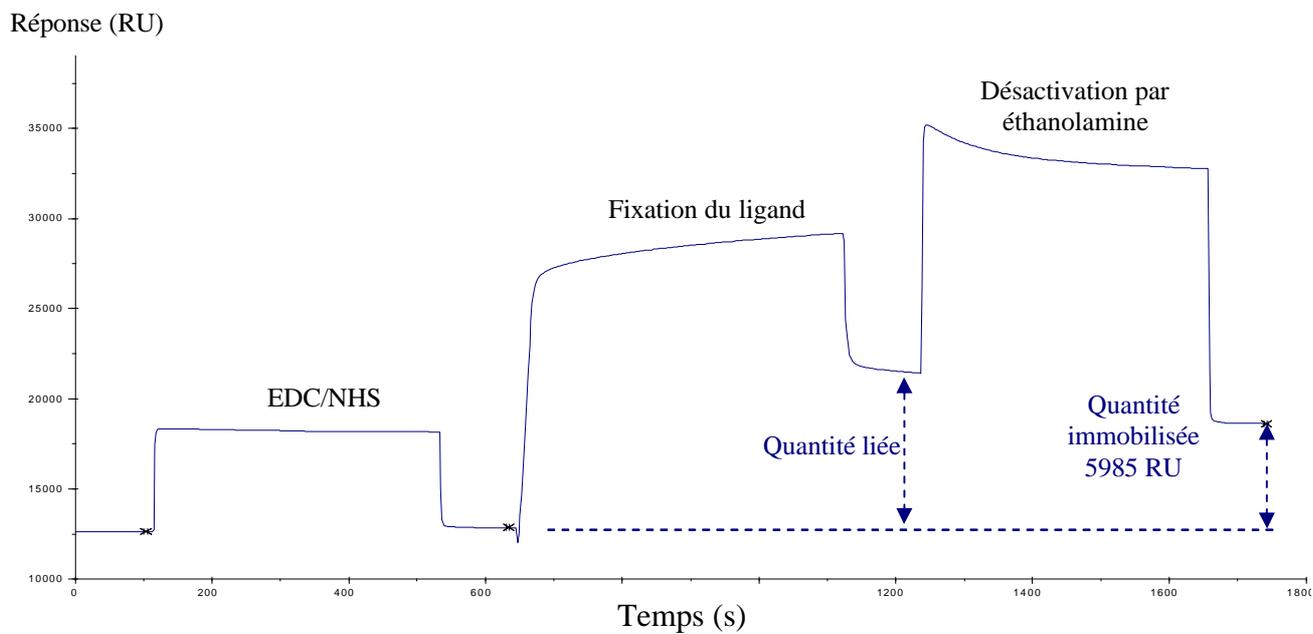


Figure III-6 : sensorgramme du couplage amine de reGH sur puce CM5 (Biacore® Q) dans les conditions mises au point. La quantité immobilisée correspond à un signal de 5985 RU.

2.3. Mise en évidence d'anticorps anti-reGH par SPR-BIA

Au préalable de l'obtention de résultats sur les échantillons d'expérimentation par cette technologie, il a été nécessaire de réaliser un important travail de mise au point sur l'instrument de Résonance Plasmonique de Surface, le BIACORE® Q. Les conditions de greffage de la reGH (temps de contact et débits des différents réactifs), le choix des paramètres de régénération de la puce ainsi que la dilution à laquelle les échantillons purifiés à l'acide caprylique devaient être injectés ont été optimisés (Tableau III-2). L'analyse des échantillons a été réalisée en mode automatique grâce à la création d'une table dans le logiciel de contrôle de l'appareil afin de garantir la répétabilité des quantités injectées.

La mise au point des conditions de greffage de la puce CM5 avec la reGH a permis d'obtenir le sensorgramme présenté Figure III-6. La quantité de reGH immobilisée permet d'obtenir un signal de 5985 RU correspondant à environ $6\text{ng}\cdot\text{mm}^{-2}$. Les échantillons de sérum collectés de J₋₇ à J₊₂₁₀ (cheval 497) et purifiés par précipitation à l'acide caprylique ont été dilués 10 fois en tampon de course HBS-EP avant d'être injectés sur la puce du BIACORE® Q greffée par reGH. La technologie SPR-BIA permet de mesurer l'interaction des anticorps sur la puce greffée par une augmentation du signal apparaissant sur le sensorgramme. La cinétique de production des anticorps a été établie à partir des différents sensorgrammes obtenus lors de l'analyse des échantillons sur canal greffé (Fc1) et non greffé (Fc2). Sur la Figure III-7, des anticorps spécifiques sont détectés dès 10 jours après le début du traitement. La concentration maximale en anticorps est observée après 20 jours, suivie d'une diminution rapide jusqu'à 45 jours. Ensuite, la diminution ralentit avant d'atteindre la ligne de base après 150 jours. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Western-Blot où les anticorps dirigés contre reGH ont pu être détectés dans les échantillons prélevés à J₊₂₀ et J₊₂₂ et pas à J₊₁₃₅. Afin d'éliminer le bruit résultant de la mesure par SPR-BIA et pour considérer uniquement le signal provenant de l'interaction des anticorps avec la puce (élimination des interactions non spécifiques), une valeur seuil a été définie, représentant 3 fois la valeur de ligne de base moyenne et correspondant à 15 RU. Dans ce contexte, le test SPR-BIA permet de détecter des anticorps de chevaux anti-reGH de 10 jours à 90 jours après la première administration d'EquiGen-5®[®], autorisant ainsi une fenêtre de détection de 80 jours. Cette technologie a prouvé qu'elle pouvait être un outil indispensable dans l'étude et la recherche d'anticorps avec une bonne sensibilité, spécificité et de « haut-débit » grâce notamment à ses fonctions automatiques et sa faible consommation d'échantillon.

Des études récentes dans le contexte de la détection frauduleuse de l'administration d'hormone de croissance à des animaux ont été réalisées par cette technologie pour l'identification de préparations injectables commerciales d'hormone de croissance recombinante bovine (Heutmekers *et al.*, 2007).

En conclusion :

Les résultats obtenus par SPR-BIA à partir des échantillons de sérum collectés de J₋₇ à J₊₂₁₀ (cheval 497) ont permis d'obtenir la première cinétique de production des anticorps anti-reGH consécutive à un traitement à l'EquiGen-5[®]. Les résultats obtenus par cette technique de détection des anticorps sont en accord avec ceux obtenus par Western-Blot. Le **seuil de détection** défini à **15 RU** a permis d'établir une **fenêtre de détection des anticorps anti-reGH de 80 jours**. Les points forts de cette technologie sont liés à la sensibilité de détection et à la capacité de traitement des échantillons « haut-débit » grâce aux plaques 96 puits avec comme inconvénient principal le coût de l'appareillage. Pour cette raison, il a été développé un test ELISA visant à permettre la détection d'anticorps anti-reGH à moindre coût.

2.4. Mise en évidence d'anticorps anti-reGH par ELISA

Avant d'obtenir des résultats sur les échantillons d'expérimentation par cette technique, il a été nécessaire de mettre au point la méthode. Après avoir défini le support 96 puits dans lequel il semblait le plus judicieux de travailler, la quantité d'hormone de croissance à greffer sur la plaque, la dilution de l'échantillon, le choix de l'anticorps secondaire ainsi que sa dilution et le temps de réaction ont été optimisés.

2.4.1. Optimisation de la méthode

2.4.1.1. Le choix du support 96 puits

Pour la problématique de détection des anticorps anti-reGH dans les échantillons purifiés à l'acide caprylique, il est nécessaire de greffer l'antigène correspondant, la molécule de reGH, sur un support adapté. Deux types de supports 96 puits en polystyrène peuvent être envisagés (Tableau III-3). Le support MaxiSorp désigne une surface en polystyrène modifié fortement chargée qui présente une grande affinité aux molécules contenant des groupes polaires ou hydrophiles. La surface possède une capacité élevée de couplage des protéines, y compris les anticorps globulaires dans une orientation correcte. La surface PolySorp est plus hydrophobe que la surface MaxiSorp.

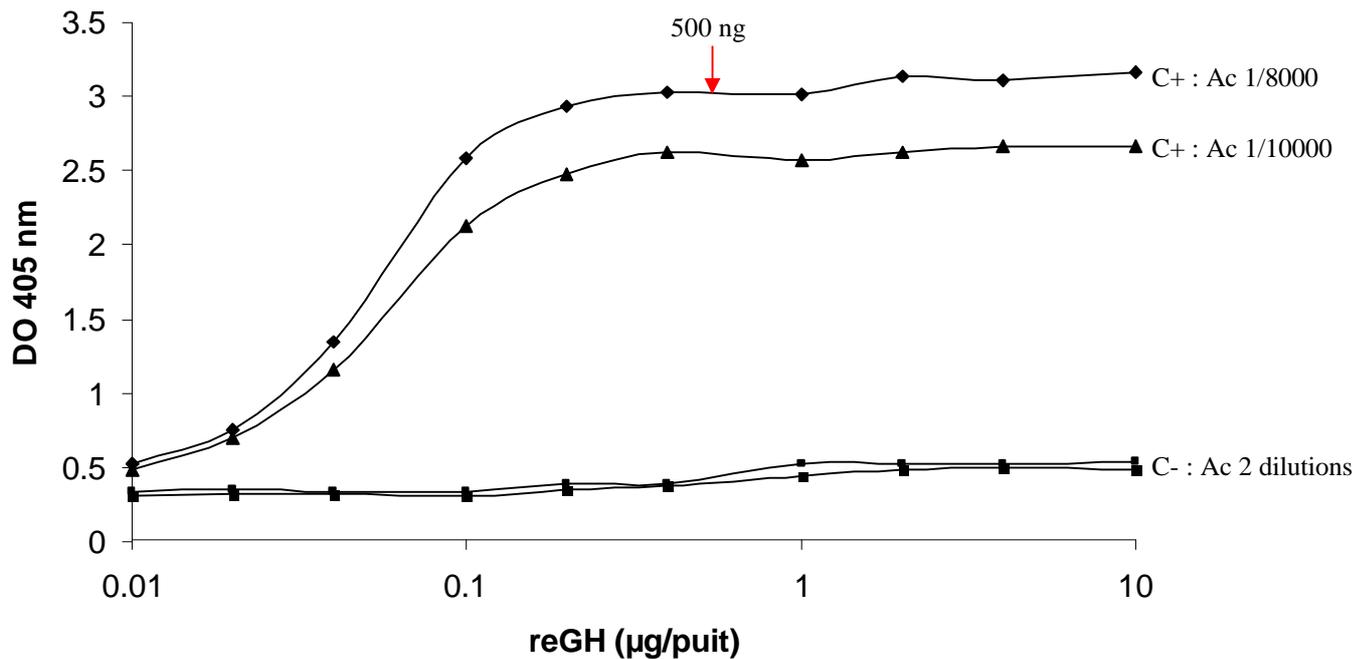


Figure III-8 : optimisation de la quantité de reGH à fixer dans les puits de la plaque MaxiSorp. Essais réalisés avec 10 concentrations (0,01 à 10 µg/puits). Chaque contrôle (C+ : J_{+22s}, 498) et (C- : J_{-2s}, 498) a été testé avec une dilution au 1/8000 et au 1/10000 de l'anticorps secondaire. Réactions suivies à 405 nm pendant 80 minutes à 37°C.

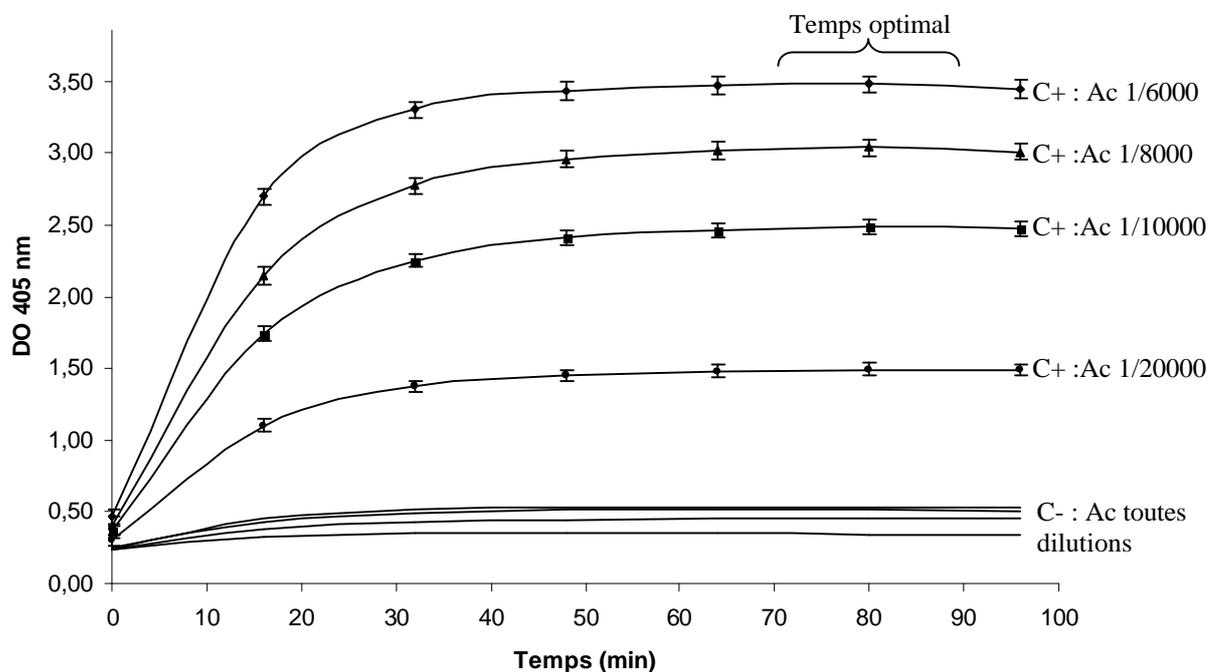


Figure III-9 : optimisation de la quantité d'anticorps secondaire à ajouter pour obtenir l'écart le plus important entre les contrôles. 500 ng/puits de reGH sont fixés. Chaque contrôle (C+ : J_{+22s}, 498) et (C- : J_{-2s}, 498) a été testé avec une dilution au 1/6000, 1/8000, 1/10000 et 1/20000 de l'anticorps secondaire. Réactions suivies à 405 nm pendant 95 minutes à 37°C avec relevé des DO toutes les 15 minutes.

Elle présente une grande affinité aux molécules ayant un caractère plus hydrophobe comme par exemple des antigènes non protéiniques. Comme l'hormone de croissance équine recombinante est une protéine globulaire simple, ne contenant ni de motif glycosidique ni de motif lipidique, le support ayant la plus grande capacité de couplage avec les protéines a été choisi.

2.4.1.2. Quantité d'hormone de croissance à greffer

La détermination de la quantité de reGH à greffer dans les puits de la plaque ELISA MaxiSorp (Figure III-8) a été réalisée en déposant en double dans les puits une quantité croissante de reGH (0,01 à 10 µg/puits). Les contrôles positifs (C+ : J₊₂₂, 497) et négatifs (C- : J₋₂, 497), provenant de la purification des IgGs à l'acide caprylique ont été dilués au 1/100 en tampon d'échantillon et déposés dans chacun des puits contenant une quantité différente de reGH. Afin de mieux appréhender la quantité de reGH à fixer sur le support, deux dilutions de l'anticorps secondaire ont été testées (1/8000 et 1/10000). La réaction enzymatique est maintenue 80 minutes à 37°C et la mesure des densités optiques est réalisée à 405 nm. Pour permettre une meilleure lecture graphique des résultats, la valeur des quantités de reGH est représentée avec une échelle logarithmique. Il n'apparaît pour le contrôle négatif aucune évolution significative de la densité optique à 405 nm pour les deux dilutions d'anticorps secondaire testées. Pour l'ensemble des points elle est de l'ordre de 0,4. Pour le contrôle positif, il y a augmentation de la DO mesurée pour les deux dilutions de l'anticorps secondaire en fonction de la quantité de reGH fixée. La courbe concernant la dilution au 1/8000 de l'anticorps secondaire a un maximum de DO à 3 à partir de 400 ng/puits. Le même résultat est obtenu avec la dilution au 1/10000 avec, comme attendu une DO maximale plus faible (2,5), impliquant qu'une quantité minimum de 400 ng/puits doit être greffée. En dessous, une faible variation des quantités de reGH fixées conduirait à de fortes variations sur les mesures de densité optique.

2.4.1.3. Choix de la dilution de l'anticorps secondaire et temps de réaction

Le choix de la dilution de l'anticorps secondaire et la détermination du temps de réaction (Figure III-9) ont été réalisés en déposant 500 ng de reGH par puit. Les contrôles positif (C+ : J₊₂₂, 497) et négatif (C- : J₋₂, 497), provenant de la purification des IgGs à l'acide caprylique ont été dilués au 1/100 en tampon d'échantillon avant d'être déposés sur la plaque. Pour déterminer la dilution de l'anticorps secondaire permettant d'obtenir l'écart de DO le plus important entre le contrôle positif et le contrôle négatif, quatre dilutions ont été testées (1/6000, 1/8000, 1/10000 et 1/20000). La réaction enzymatique a été maintenue 95 minutes à 37°C et la mesure des densités optiques a été réalisée à 405 nm toutes les 15 minutes.

Il n'est apparu pour le contrôle négatif aucune évolution significative de la densité optique à 405 nm pour les quatre dilutions d'anticorps secondaire testées. Pour l'ensemble des points elle était de l'ordre de 0,4 à 0,5. Pour le contrôle positif, il y a augmentation en fonction du temps de la DO pour chacune des dilutions de l'anticorps secondaire. L'augmentation a été progressive, pour ensuite atteindre un plateau à 45 minutes. La DO augmentée légèrement jusqu'à 70 minutes pour atteindre un maximum de 3,5 pour la dilution au 1/6000, un maximum de 3 pour la dilution au 1/8000, un maximum de 2,4 pour la dilution au 1/10000 et un maximum de 1,4 pour la dilution au 1/20000. Ces DO maximales ont été stables pendant 20 minutes, ensuite une légère diminution a été observée. Le maximum d'écart de DO ($\Delta = 3$) entre le contrôle positif et le contrôle négatif a été obtenu pour la dilution de l'anticorps secondaire au 1/6000. Cette dilution, bien que permettant un écart important entre les DO contrôles, n'a pas pu être conservée car 3,5 était la DO maximale de saturation atteinte par l'appareil. Le choix a donc été fait d'utiliser la dilution de l'anticorps secondaire au 1/8000 permettant un écart de DO de 2,5 entre le contrôle positif et le contrôle négatif.

En conclusion :

En raison de sa **capacité de couplage élevée des protéines**, le support choisi pour réaliser le test ELISA a été un **support MaxiSorp**. Si au cours du développement, il était apparu des problèmes liés à l'interaction de reGH dans les puits, le support PolySorp aurait été testé ainsi que les plaques permettant une liaison covalente entre la molécule et son support. Comme le comportement de l'anticorps secondaire marqué est identique en présence de substrat lorsque celui-ci est libre ou lié, il est nécessaire d'éliminer les anticorps libres par des lavages successifs : le principe de détection des anticorps est donc réalisé en **phase homogène**. Pour obtenir un test ELISA robuste, **la quantité de reGH à fixer dans les puits de la plaque a été fixée à 500 ng**. L'ajout de quantités supplémentaires aurait augmenté le coût du test ELISA sans pour autant en augmenter la sensibilité. En dessous, une faible variation des quantités déposées aurait pu avoir des conséquences non négligeables sur la répétabilité des mesures de DO. De plus, pour permettre de discriminer fortement les échantillons contenant des anticorps anti-reGH de ceux n'en contenant pas, **la dilution de l'anticorps secondaire est fixée au 1/8000**. Le maximum de DO est atteint à partir de 70 min et est stable pendant 20 minutes. **La DO devra être mesurée à 405 nm après 80 minutes d'incubation à 37°C**.

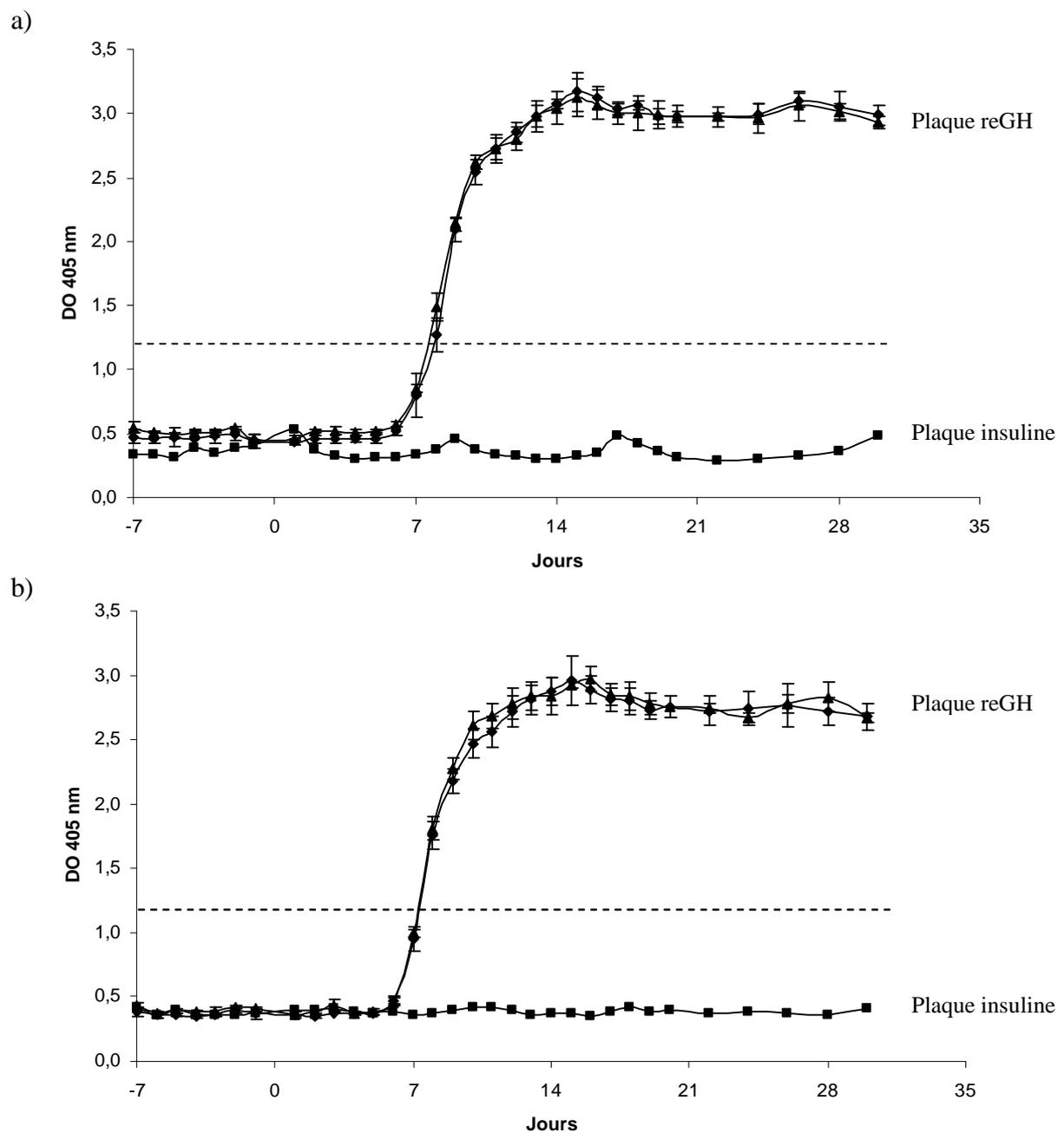


Figure III-10 : cinétiques de production des anticorps anti-reGH obtenues à partir des échantillons sériques et plasmatiques J_{.7} à J_{.+30} (a : cheval 497 ; b : cheval 498) mesurée par ELISA à 405 nm sur des plaques revêtues de reGH et sur une plaque revêtue d'insuline porcine. La valeur seuil est présentée en pointillés (DO = 1,2).

2.4.2. Application du test ELISA mis au point aux échantillons des expérimentations 497 et 498

Après la mise au point du test ELISA, l'ensemble des échantillons sériques et plasmatiques des deux chevaux (497 et 498) ont été purifiés à l'acide caprylique. L'étude de la présence d'anticorps est généralement pratiquée sur le sérum ; il a été décidé dans cette étude de réaliser la détection des anticorps anti-reGH à la fois sur les matrices sérum et plasma des chevaux car le plasma est la matrice utilisée en contrôle antidopage des chevaux de courses. Pour évaluer la répétabilité des mesures, les échantillons plasmatiques et sériques J₇ à J₊₃₀ de chacun des animaux ont été déposés en double sur la plaque. Les analyses ont été reproduites 3 jours différents (Figure III-10). L'estimation de l'interaction non spécifique au moyen de la plaque ELISA contenant de l'insuline porcine (500 ng/puits) a été réalisée une fois en double à partir des échantillons plasmatiques de chacun des chevaux.

Une interaction spécifique entre la reGH fixée dans les puits de la plaque et les anticorps anti-reGH présents dans le plasma et le sérum est mis en évidence de J₊₇ à J₊₃₀ avec un maximum atteint à J₊₁₆ pour les deux chevaux. Pour l'ensemble des mesures de DO réalisées, les écart-types relevés sont faibles, impliquant une très bonne répétabilité de la mesure pour l'ensemble des échantillons.

Pour le cheval 497 (Figure III-10 a), la cinétique de production des anticorps anti-reGH obtenue par lecture de DO à 405 nm de la plaque ELISA à partir du plasma est identique à celle obtenue à partir du sérum. La même interprétation est faite pour les cinétiques obtenues pour le cheval 498. Il semble donc que pour un cheval donné, les cinétiques de production des anticorps anti-reGH dans le plasma et le sérum soient superposables. Cette superposition des cinétiques peut-être expliquée par la forte élimination des protéines contenues dans l'échantillon (70 %) lors de l'étape de purification des IgGs par précipitation à l'acide caprylique. Les échantillons déposés sur la plaque revêtue d'insuline porcine ne montrent aucune évolution de la densité optique à 405 nm. Par conséquent, le bruit de fond des interactions non spécifiques correspondant à la ligne de base peut-être défini à 0,4. Pour ce test ELISA, une valeur seuil a été définie à $DO_{405nm} = 1,2$, correspondant à trois fois la DO mesurée pour la valeur moyenne de la ligne de base. La superposition des cinétiques de production de anticorps contenu dans le sérum des chevaux 497 et 498, collecté pendant 6 mois est présentée Figure III-11. Cette importante collecte d'échantillons permet de mettre en évidence un profil d'immunisation en trois étapes.

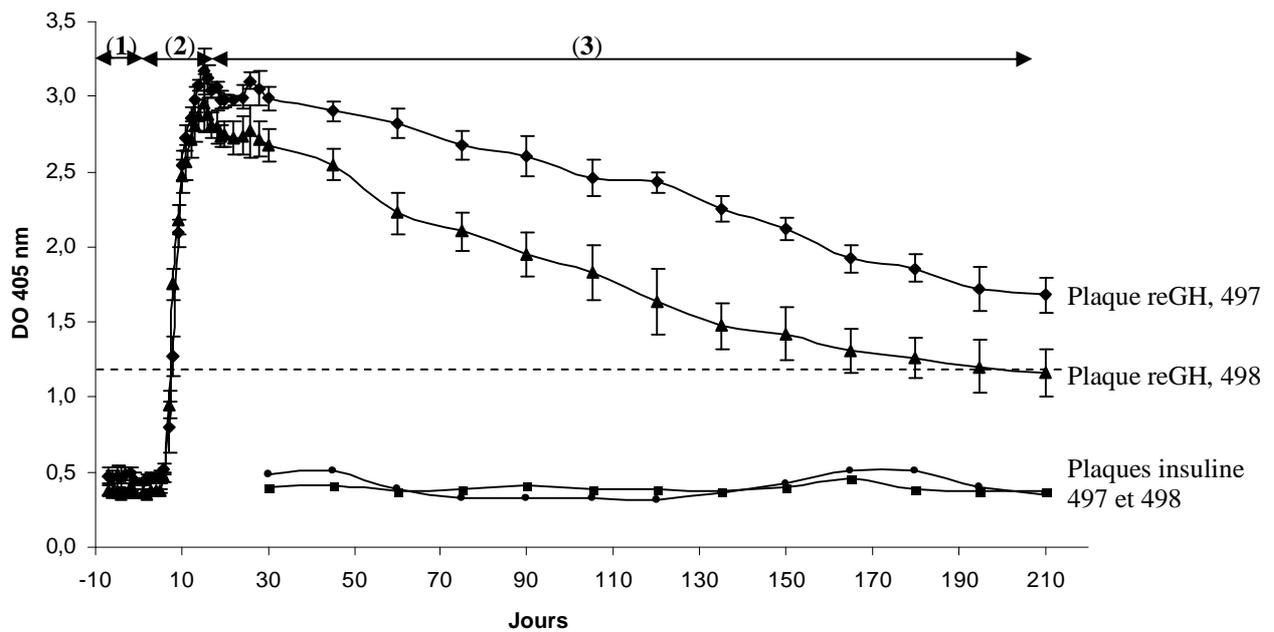


Figure III-11 : cinétiques de production des anticorps anti-reGH obtenues à partir des échantillons sériques J₋₇ à J₊₂₁₀ (chevaux 497 et 498) mesurée par ELISA à 405 nm sur des plaques revêtues de reGH et sur une plaque revêtue d'insuline porcine. La valeur seuil est présentée en pointillés (DO = 1,2).

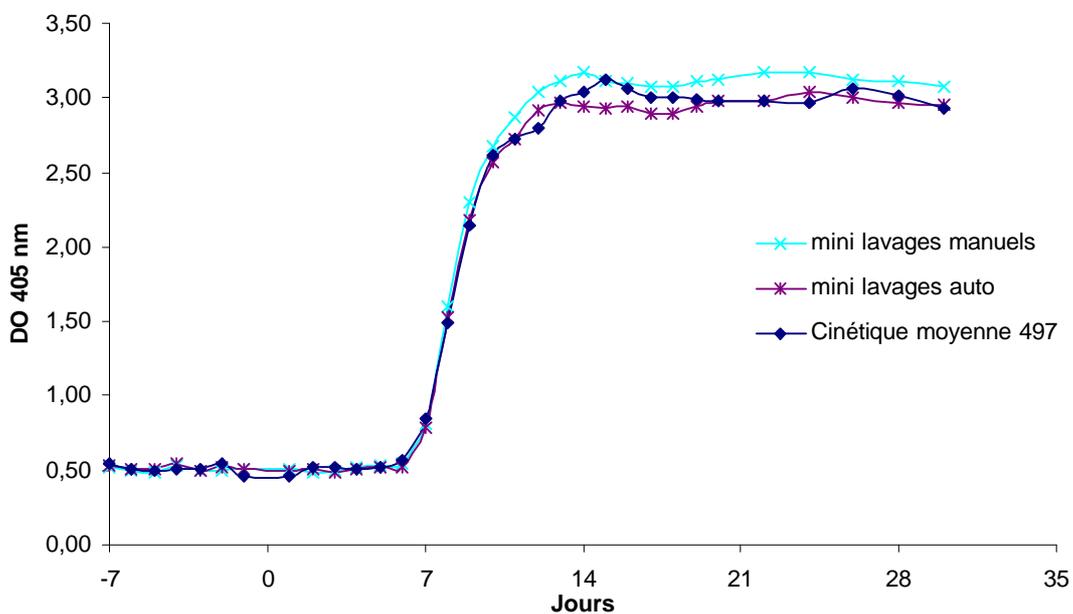


Figure III-12 : comparaison des cinétiques de production des anticorps anti-reGH obtenues à partir de la méthode initiale, de la méthode de précipitation des échantillons à l'acide caprylique en microplaque avec des lavages manuels et de la méthode de précipitation des échantillons à l'acide caprylique en microplaque avec des lavages automatiques. Mesure réalisée par ELISA à 405 nm sur des plaques revêtues de reGH. Échantillons plasmatiques (J₋₇ à J₊₃₀, 497).

La première phase, définie de J₋₇ à J₊₇, correspond aux échantillons des animaux avant traitement (blancs) ainsi que ceux du début du traitement dans lesquelles aucun anticorps anti-reGH n'est détecté. La seconde, très rapide, de J₊₈ à J₊₁₆ est associée à une production exponentielle d'anticorps anti-reGH, où un maximum est atteint à J₊₁₆. La troisième, de J₊₁₇ à la fin de la collecte correspond à l'étape de catabolisme de ces anticorps ainsi que leur probable élimination dans des complexes immuns. Dans ces conditions, le seuil défini à DO_{405nm} = 1,2 permet de détecter des anticorps anti-reGH de J₊₈ à J₊₂₁₀ après le début du traitement, offrant ainsi une fenêtre de détection de la fraude de près de 200 jours, soit 6 mois.

En conclusion :

Les résultats obtenus par ELISA à partir des échantillons de sérum collectés de J₋₇ à J₊₂₁₀ (chevaux 497 et 498) ont permis d'obtenir une nouvelle cinétique de production des anticorps anti-reGH consécutive à un traitement à l'EquiGen-5[®]. Les résultats obtenus par cette technique de détection des anticorps sont en accord avec ceux obtenus par Western-Blot et SPR-BIA et les complètent. Le **seuil de détection** défini à une DO_{405nm} = **1,2** a permis de définir une **fenêtre de détection allongée des anticorps anti-reGH de 200 jours**. Les points forts de cette technologie sont liés à la sensibilité de détection et la capacité importante de traitement des échantillons grâce aux plaques 96 puits. Cependant, les étapes de préparations des échantillons en « eppendorfs » étant longues, la technique de préparation des échantillons a été optimisée en microplaques afin de travailler presque exclusivement avec des pipettes multicanaux pour augmenter la capacité de dépistage. Toutes les étapes de lavage des plaques ELISA ont été optimisées en utilisant un « laveur automatique » pour améliorer la répétabilité des mesures.

2.4.3. Corrélation des résultats entre méthode initiale et miniaturisée

La précipitation des échantillons plasmatiques ou sériques à l'acide caprylique a été optimisée en microplaques à puits coniques. Après mise au point, le volume de prise d'essai de 870 µL initialement prélevé est abaissé à 260 µL. Les 80 µL d'acide chlorhydrique 0,5 M et les 50 µL d'acide caprylique ont été optimisés avec la nouvelle prise d'essai respectivement à 25 µL et 15 µL. Au préalable du dépôt de l'échantillon, les réactifs ont été déposés dans la microplaque grâce à une pipette multicanaux. Le temps de précipitation fixé à 1 heure est ramené à 20 minutes. La capacité de centrifugation des échantillons permise par la miniaturisation de la méthode est multipliée par 8 (192 en 2 microplaques contre 24 en « eppendorfs »).

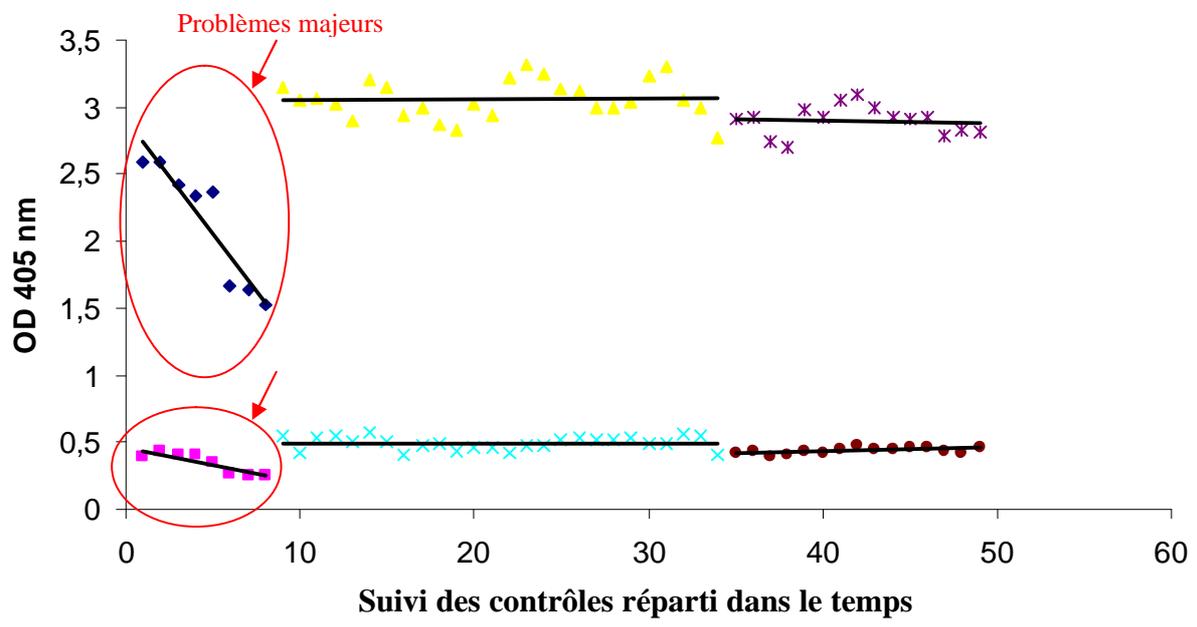


Figure III-13 : suivi longitudinal des contrôles positifs et négatifs appliqués lors de la réalisation des ELISA.

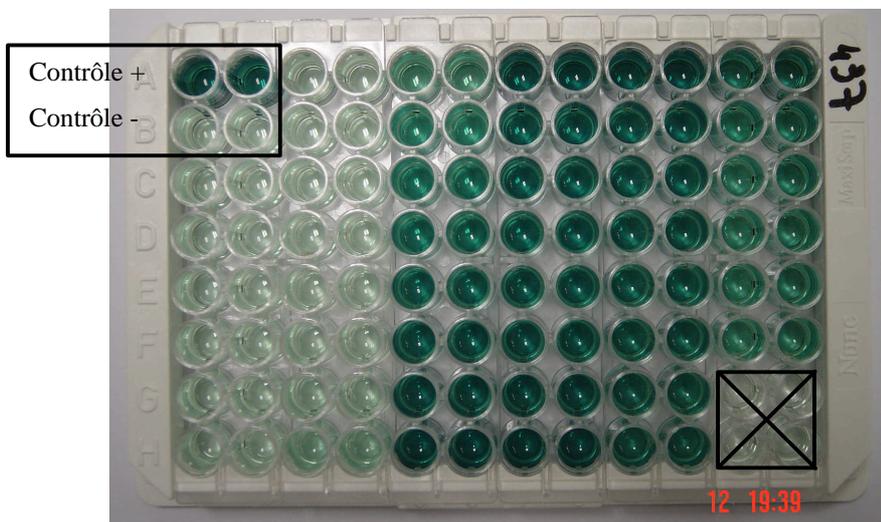


Figure III-14 : mise en évidence de la production des d'anticorps sériques anti-reGH par ELISA après incubation. Échantillons J₋₇ à J₊₂₁₀ (cheval 497).

De plus, une attention particulière a été portée sur la programmation du laveur automatique de microplaques afin de ne pas détériorer les interactions biologiques (débit et force des dépôts et aspirations de la solution de lavage). La Figure III-12 rend compte des performances de la méthode « miniaturisée » mise au point. Les 3 courbes obtenues sont superposables ce qui permet de valider la transformation de la méthode initiale en méthode miniaturisée.

En conclusion :

La méthode initialement développée a été miniaturisée avec succès, permettant ainsi de diminuer le **volume de prise d'essai** de près de 600 μL avec un volume optimisé à **260 μL** . Le **temps de réaction** fixé à 1 heure est ramené à **20 minutes**. Grâce à la miniaturisation, la **capacité de centrifugation des échantillons** lors de la précipitation à l'acide caprylique est **multipliée par 8**.

2.4.4. Suivi longitudinal des contrôles

Dès le début de ce travail, un suivi longitudinal des contrôles positifs et négatifs utilisés pour valider les mesure de $\text{DO}_{405\text{nm}}$ du test ELISA a été réalisé afin de s'assurer de la robustesse de la méthode. La collecte des informations est présentée Figure III-13. L'interprétation graphique de ces données a permis de mettre en évidence une dégradation du signal et de diagnostiquer au bout d'un mois qu'un ou des réactifs utilisés pour la réalisation du test ELISA ne se conservaient pas correctement à 4°C. Pour remédier à cette baisse de sensibilité, les solutions tampons ont été préparées chaque semaine et les réactifs biologiques ont été dilués extemporanément à la réalisation de la plaque. Le suivi longitudinal a permis au quotidien de définir une certaine tolérance sur les écarts de DO mesurées, fixée à 7 % par rapport aux moyennes des DO antérieurement mesurées pour ce contrôle. Pour les échantillons testés au dessus du seuil défini à $\text{DO}_{405\text{nm}} = 1,2$, si la DO du contrôle positif présente plus de 7 % d'écart avec sa valeur moyenne, il est de nouveau testé et extrait. La Figure III-14 présente la plaque ELISA réalisée pour la détection d'anticorps anti-reGH dans le sérum J-7 à J₊₂₁₀ (497). Sur cette figure sont présentés les contrôles positifs et négatifs obtenus pour valider la plaque.

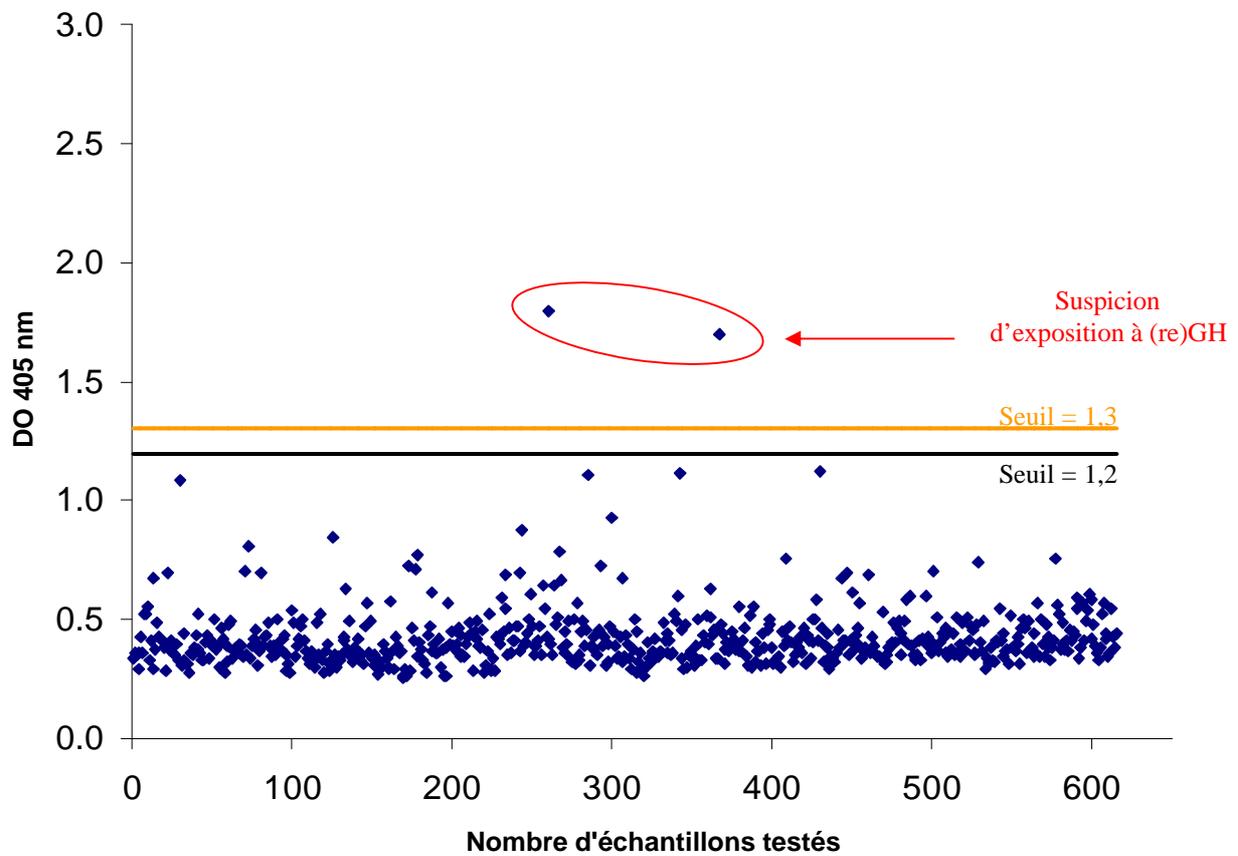


Figure III-15 : dépistage de l'exposition des chevaux de courses à l'hormone de croissance équine recombinante. 615 plasmas de routine précipités à l'acide caprylique et testés en aveugle sur la plaque ELISA revêtue de reGH pour mettre en évidence des anticorps anti-reGH dans ces échantillons.

En conclusion :

Le suivi longitudinal des contrôles a permis de mettre en évidence des problèmes lors de la réalisation des plaques ELISA et de mettre en œuvre des actions correctives pour les résoudre. La mesure de DO_{405nm} des contrôles positifs a permis de déterminer une **tolérance de 7 % sur la valeur lue**. Lors d'**échantillons suspects ($1,1 < \text{seuil } DO_{405nm} < 1,3$)**, si le contrôle positif de la plaque présente plus ou moins 7 % d'écart avec la valeur moyenne, l'échantillon suspect doit être **de nouveau retesté et extrait pour une troisième confirmation de la mesure**.

2.4.5. Application de l'ELISA à 615 animaux de routine

Afin de réaliser une première estimation de l'exposition des chevaux de course à l'hormone de croissance équine recombinante, 615 plasmas d'animaux de routine ont été purifiés à l'acide caprylique pour en obtenir les IgGs. La population était répartie en 188 femelles, 281 hongres, 117 mâles et 29 animaux dont le sexe ne nous a pas été communiqué. La Figure III-15 représente les DO_{405nm} mesurées après ELISA pour chacun de ces échantillons. Le seuil fixé à $DO_{405nm} = 1,2$ a été réévalué en tenant compte de la moyenne des DO relevées pour ces 615 animaux afin de définir une ligne de base statistique plus affinée. La valeur moyenne obtenue correspond à 0,421. Si l'on considère le seuil à 3 fois la ligne de base moyenne, le seuil réajusté est de $0,421 \times 3 = 1,263$ soit environ 1,3. L'écart de DO entre les deux seuils étant faible (0,1), et si l'on applique ce seuil aux échantillons des expérimentations 497/498, les temps de détection des anticorps anti-reGH définis par ELISA avec le seuil de 1,2 sont inchangés. Sur les 615 animaux testés, 6 ont montré des DO_{405nm} supérieures à 1,1. Pour ces 6 animaux, la détermination de la concentration en IGF-1 plasmatique a été réalisée par ELISA. Toutes les concentrations relevées ont été très inférieures au seuil de 860 ng.mL^{-1} . Parmi les 615 animaux, deux sont néanmoins sortis de manière importante du lot. Pour ces deux animaux, une suspicion d'exposition à l'hormone de croissance équine recombinante a été émise. Les mesures de DO ont été confirmées 4 fois à partir de deux purifications différentes des IgGs plasmatiques à l'acide caprylique.

En conclusion :

Deux techniques de screening « haut-débit » pour détecter la production d'anticorps anti-reGH résultant d'un traitement à l'EquiGen-5[®] chez le cheval ont été mises au point dans le plasma et sérum. La précipitation des échantillons à l'acide caprylique pour obtenir des IgGs est une étape clé de la méthode favorisant ainsi une importante augmentation de la sensibilité de détection. Les résultats obtenus pour les deux matrices sont similaires permettant ainsi de conclure que le dépistage des anticorps anti-reGH peut doré et déjà être pratiqué avec les tubes héparinés actuellement disponibles sur les hippodromes de France.

L'ELISA et la technologie SPR-BIA autorisent une détection des anticorps anti-reGH chez le cheval respectivement pendant 200 jours et 80 jours après le début du traitement avec une bonne répétabilité et spécificité des méthodes. Au cours de ce travail, la méthode ELISA initialement développée a été miniaturisée avec succès, permettant ainsi de diminuer le volume de prise d'essai de près de 600 μL avec un volume optimisé à 260 μL . Le temps de préparation de l'échantillon a été raccourci, favorisant une augmentation de la capacité de traitement des échantillons d'un facteur 8. L'emploi du laveur automatique de microplaque a également permis d'améliorer la répétabilité des mesures.

L'utilisation du test ELISA de détection des anticorps anti-reGH a été utilisé « en aveugle » avec succès sur 615 chevaux de course. Cette étude a permis d'**ajuster** le **seuil de suspicion** à **1,3** et de détecter 2 animaux suspects dont une **levée d'anonymat** a été pratiquée par la Fédération Nationale des Courses Françaises. Un dosage de l'IGF-1 plasmatique a été pratiqué sur ces deux échantillons et les concentrations obtenues étaient très inférieures au seuil de 860 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Pourtant, il semble que la détection des anticorps anti-reGH par SPR-BIA ou ELISA pendant le traitement puisse permettre une bonne complémentarité dans l'interprétation des concentrations en IGF-1 élevées, c'est-à-dire légèrement supérieures au seuil de 860 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

D'autre part, une expérimentation avec 8 chevaux traités à l'EquiGen-5[®] a été réalisée pour obtenir prochainement davantage d'informations concernant la détection d'anticorps anti-reGH et accroître les connaissances sur les possibilités de détection simultanée des IGF-1 et des anticorps anti-reGH dans le plasma. Il semble judicieux de croire, que les fenêtres de détections obtenues dans ce travail, par la détection d'anticorps anti-reGH comme biomarqueur de l'administration de reGH ne soient jamais atteintes par aucune méthode de détection directe. La détection d'anticorps semble donc être un outil de dépistage puissant utilisable en antidopage équin ou pour surveiller des élevages suspects d'animaux de rente (bovins, porcins).

Tableau III-4 : temps de détection des animaux traités par EquiGen-5 au moyen de différentes méthodes de dépistage : dosage de la concentration en IGF-1 plasmatique, détection des anticorps anti-reGH par Résonance Plasmonique de Surface (SPR) et par ELISA

Mois	1				2				3				4 - 5				6			
Semaines	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
IGF-1																				
Ac par SPR																				
Ac par ELISA																				

3. CONCLUSION DE LA PREMIÈRE PARTIE

La législation interdisant l'utilisation des hormones de croissance en Europe, le premier objectif de ce travail a consisté à réaliser avec les échantillons d'expérimentations animales (chevaux pur-sang) le suivi de marqueurs secondaires (dépistage) de l'administration de l'hormone de croissance recombinante tels que l'IGF-1 ou les anticorps anti-reGH. Le Tableau III-4 présente la comparaison des informations obtenues par la recherche des marqueurs secondaires de l'administration de l'hormone de croissance en terme de concentration en IGF-1 plasmatique, de détection des anticorps anti-reGH obtenue par SPR et par ELISA. La détection des anticorps anti-reGH par SPR-BIA ou par ELISA au-dessus de leurs seuils de décision respectifs débute au même moment que celle des IGF-1 plasmatiques au dessus de 860 ng.mL^{-1} , soit 8 à 9 jours après traitement à la reGH (arrondi à une semaine). Le temps de détection après le début du traitement est donc considéré comme identique et dans ce contexte, une suspicion d'utilisation frauduleuse de reGH détectée par mesure des IGF-1 pourra être confirmée ou non par recherche des anticorps (et réciproquement). En revanche, la détection des IGF-1 n'est possible que pendant une petite dizaine de jours tandis que la détection des anticorps anti-reGH est possible pendant 80 jours par SPR-BIA ou 200 jours par ELISA.

Les différences observées entre les formes des cinétiques obtenues pour la détection des anticorps anti-reGH par SPR-BIA et ELISA sont expliquées comme résultant des conditions d'éluion assez drastiques employées en SPR pour rompre toutes les interactions protéines-protéines entre reGH et les IgGs sur la puce lors de l'étape de régénération de celle-ci.

La mise en évidence d'anticorps anti-reGH consécutive à un traitement à l'hormone de croissance équine recombinante peut être expliquée par la présence de la méthionine surnuméraire en position N-terminal ainsi que des séquences immunoréactives de l'hormone de croissance déjà rapportées dans la littérature (Mollerach-Gobbi *et al.*, 1990). De plus, il est à considérer une association probable des caractéristiques précédentes avec une faible réaction inflammatoire au point d'injection. En effet, au cours de l'expérimentation animale une telle inflammation a été observée pour chacun des deux chevaux. En outre, il a été rapporté que les hormones de croissance (humaine, ovine, bovine et équine) possédaient une séquence antigénique commune correspondant à la séquence 73-128. Cela suggère donc que la SPR-BIA ou l'ELISA dont la plaque serait revêtue avec cette séquence pourraient être appropriée à la détection d'anticorps anti-GH d'autres espèces.

Les résultats obtenus ont permis de ramener le délai de détection des anticorps anti-GH chez le cheval obtenu par Bonnaire (Bonnaire *et al.*, 1998) de 40 jours à 9 jours après administration de rGH. De plus, il est vraisemblable que les résultats de délai de détection d'anticorps anti-rbGH 28 jours après traitement obtenus chez le bovin (Pinel *et al.*, 2005) puissent aussi être ramenés à une dizaine de jours au moyen de l'ELISA ou de la SPR.

D'autre part, il est à prévoir que le temps de détection des anticorps soit largement augmenté si il était administré aux animaux des hormones de croissance hétérologues où il est fort probable que l'organisme de ces animaux traités produise davantage d'anticorps en réponse à une stimulation par reconnaissance du « non-soi » accrue.

Enfin, la détection d'anticorps en réponse à un traitement contenant une protéine n'est pas seulement rapportée dans le cas de la GH mais aussi lorsque des traitements à l'insuline, la prolactine ou l'EPO ont été pratiqués. Dans ce contexte, le suivi des anticorps produit en réponse à l'administration de xénobiotiques protéiques pourrait être utilisé comme méthode de dépistage en antidopage équin ou appliqué aux animaux de rente à condition toutefois que la technologie puisse le permettre.

Après la mise en évidence d'une suspicion de dopage à l'hormone de croissance grâce aux marqueurs secondaires de l'administration de rGH, la suite de ce travail a consisté à mettre au point un protocole de purification de reGH dans le plasma pour pouvoir disposer d'une méthode suffisamment sensible et spécifique pour permettre de discriminer les GH des rGH dont la concentration physiologique de la forme endogène est comprise entre 1 et 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Ce travail de développement d'une méthode de confirmation de rGH dans le plasma est présenté dans la seconde partie de ce chapitre.

***PARTIE - 2 MÉTHODES DE DÉTECTION
DIRECTES DE L'HORMONE DE CROISSANCE
ÉQUINE RECOMBINANTE***

1. INTRODUCTION

Les études structurales des hormones de croissance endogènes et recombinantes, connues depuis quelques années et réalisées par spectrométrie de masse, ont permis de définir qu'une discrimination entre les deux types de molécules pouvait être envisagée par la partie N-terminale de chacune d'entre elles car des différences dans leur séquence en acides aminés existent. Une stratégie analytique de purification, de détection, et d'identification permettant la discrimination entre les formes endogène et recombinante de l'hormone de croissance équine dans une matrice biologique (plasma, urine) a donc été recherchée. En terme de technique de mesure, notre choix s'est assez naturellement porté vers la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse ; ce type de couplage constitue en effet un outil incontournable pour étudier les protéines et les peptides. Le travail mis en œuvre a consisté à créer une purification rigoureuse des échantillons afin de réduire au maximum la présence de composés interférents dans les extraits finaux, puis à l'optimiser afin d'atteindre les objectifs de spécificité et de sensibilité souhaités.

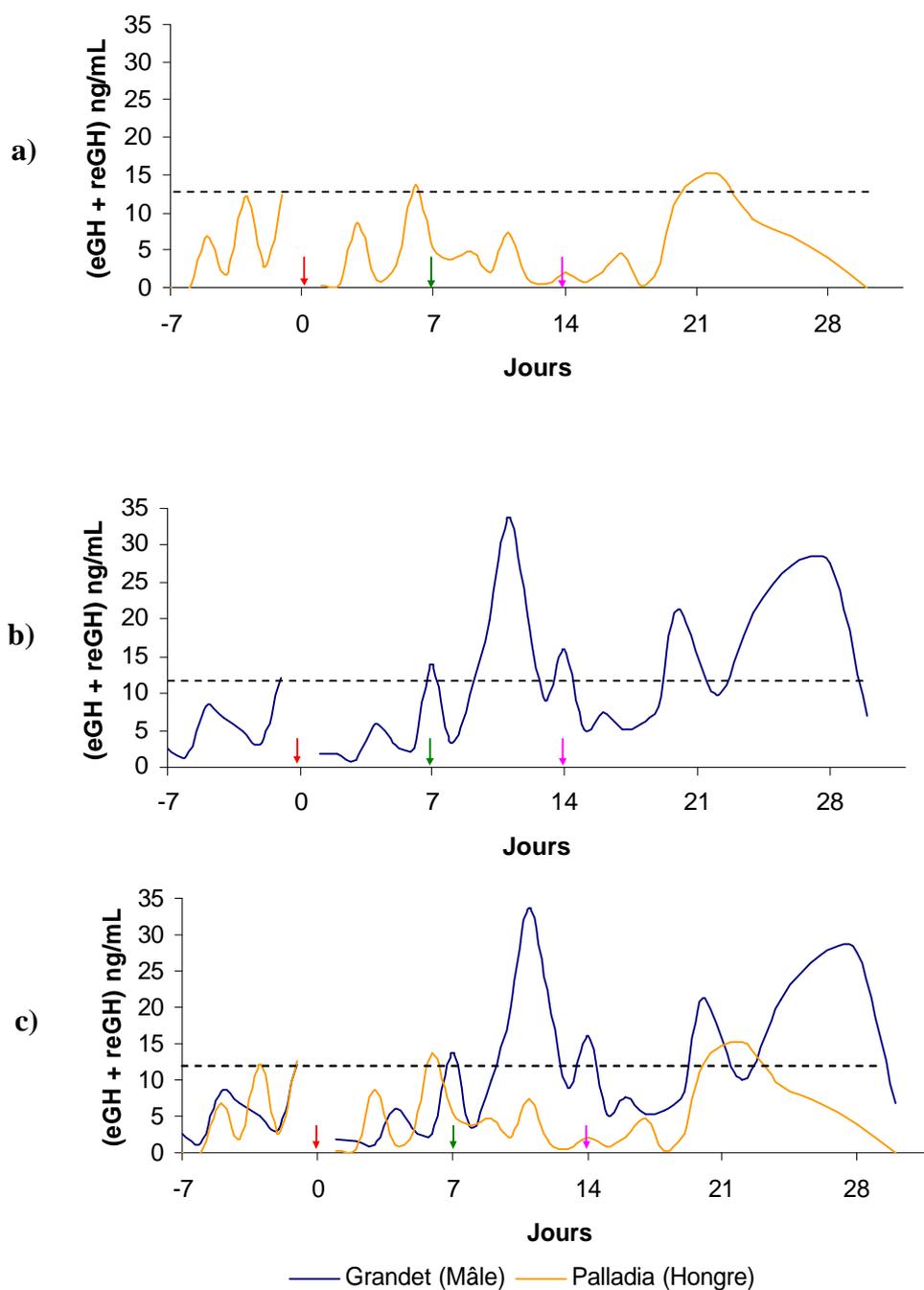


Figure III-16 : concentrations totales (eGH + reGH) déterminées par RIA, J_{+1} à J_{+30} cheval 497 (a), cheval 498 (b) et superposition des deux courbes obtenues (c). Les concentrations obtenues pour les jours avant traitement J_{-7} à J_{-1} sont foncées. Les flèches de couleur désignent les posologies d'EquiGen-5[®] administrées rouge (18 $\mu\text{g}/\text{kg}$), vert (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) et rose (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Le trait en pointillé représente la quantité maximale d'eGH mesurée pendant une semaine avant le traitement.

2. PAR RADIOIMMUNO-ESSAI (RIA)

Dans le cadre de la thèse consistant en la mise au point d'une méthode directe de détection de l'hormone de croissance équine recombinante par spectrométrie de masse dans le plasma, un dosage de la reGH dans les échantillons de plasma des deux chevaux d'expérimentation a été réalisé par RIA. Cette technologie, sensible ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$), devait permettre de définir les objectifs de détection en terme de concentration en GH dans les échantillons de plasma. Toutefois, il est très important de souligner que cette technique ne permet aucunement de discriminer les formes endogène et recombinante de GH et que les concentrations mesurées sont des concentrations totales (eGH + reGH). Ce travail a eu lieu en collaboration avec le département de Physiologie animale de l'INRA de Tours-Nouzilly dans l'unité de recherche de Physiologie de la Reproduction et des Comportements (PRC), plus précisément, dans l'équipe de Neurobiologie et Maîtrise des Fonctions Saisonnières. Le Dr Daniel Guillaume a permis la réalisation du dosage sur la base de leur maîtrise de la technologie RIA. Il travaille principalement sur la saisonnalité de la reproduction des équidés, fortement influencée par leur niveau d'alimentation.

La Figure III-16 présente les concentrations totales plasmatiques (eGH + reGH) obtenues de J_{-7} à J_{+30} par RIA pour les chevaux Palladia (497) et Grandet (498). En ce qui concerne le cheval Palladia, une concentration d'eGH + reGH n'excédant pas 15 ng.mL^{-1} est observée tout au long de l'étude. Il n'y a pas de différence entre les concentrations mesurées avant traitement (13 ng.mL^{-1}), pendant et après. L'analyse des plasmas du cheval Grandet permet d'observer une concentration cumulée totale n'excédant pas 34 ng.mL^{-1} . Les concentrations d'eGH mesurées pendant une semaine avant le traitement sont de l'ordre de 12 ng.mL^{-1} , cette concentration est très largement dépassée en J_{+11} , avec 34 ng.mL^{-1} puis, après le traitement, les concentrations en J_{+26} et J_{+28} sont à nouveau plus élevées (27 ng.mL^{-1}).

La superposition des deux courbes du dosage de l'eGH montre clairement un effet pulsatile avec des valeurs de concentration *quasi* identiques jusqu'à J_{+8} pour les deux chevaux. Ensuite, un comportement différent apparaît. Dans le cas de Grandet (mâle), une augmentation progressive de forte importance pendant trois jours est observée pour atteindre 34 ng.mL^{-1} à J_{+11} tandis que dans le cas de Palladia (hongre), les administrations de reGH semblent n'avoir eu aucun effet sur la concentration en eGH plasmatique.

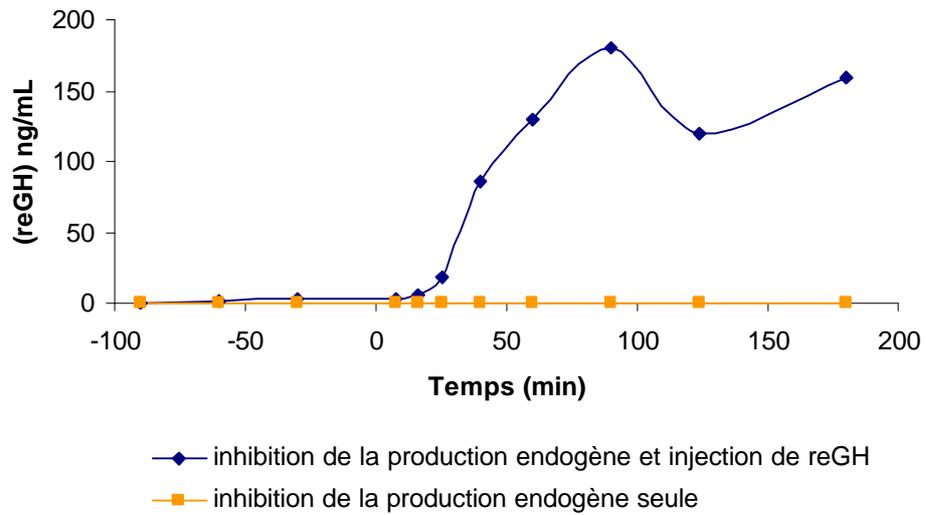


Figure III-17 : expérimentation 563, concentrations plasmatiques de reGH déterminées par RIA pendant 3 heures après une injection d'EquiGen-5® à la dose de 25 µg/kg avec inhibition de la production endogène de GH par l'octréotide. L'effet de l'octréotide seule sur la production endogène d'eGH a été évaluée sur ce même animale un jour avant aux mêmes heures (courbe orange).

Comme les échantillons ont été collectés toutes les 24 heures après l'administration de reGH et compte tenu de la faible durée de vie de l'eGH annoncée à quelques minutes, il semble que les mesures aient été réalisées trop tard pour observer une augmentation importante de la concentration de reGH dans le plasma des animaux traités. Une seconde expérimentation animale a alors été réalisée (563). Un dosage de reGH avec des temps de prélèvements de plasma plus courts (quelques heures) après une injection unique d'EquiGen-5[®] a été réalisé pour observer une cinétique d'élimination de la molécule. Afin de ne mesurer que l'hormone de croissance administrée, la production de GH endogène a été inhibée avec de l'octréotide, analogue structural de la somatostatine. L'expérimentation animale a été réalisée au préalable avec l'octréotide seule 1 jour avant sans injection de reGH, pour vérifier l'effet d'inhibition de l'octréotide sur la production endogène d'hormone de croissance par l'animal.

Les données RIA ainsi obtenues sont présentées Figure III-17. Le rôle d'inhibiteur de l'octréotide est vérifié car toutes les concentrations mesurées, liées à une production endogène d'eGH, sont inférieures à la limite de quantification de la méthode (1 ng.mL⁻¹). Le jour suivant, avec l'injection de reGH après l'administration d'octréotide, des concentrations très importantes ont été mesurées. 25 minutes après l'injection, une concentration de reGH à 18 ng.mL⁻¹ est observée, puis la concentration augmente régulièrement jusqu'à un maximum de 180 ng.mL⁻¹ après 90 minutes. Une diminution à 120 ng.mL⁻¹ à 120 minutes apparaît puis une nouvelle augmentation de concentration est observée pour atteindre 160 ng.mL⁻¹ à 180 minutes.

En conclusion :

Le dosage par RIA ne permet pas de discriminer la production endogène d'eGH de potentielles traces de reGH dans le plasma consécutives à une administration d'EquiGen-5[®]. Les concentrations sur 24 heures enregistrées pendant les 37 jours des expérimentations 497 et 498 sont en moyenne de l'ordre de 15 ng.mL⁻¹ ce qui fixe les objectifs du développement de la méthode directe de détection de reGH par spectrométrie de masse en terme de limite de détection à 10 à 15 ng.mL⁻¹. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature où les concentrations d'eGH dans le plasma sont rapportées de l'ordre de 1 à 10 ng.mL⁻¹ (Thompson Jr *et al.*, 1992 ; Stewart *et al.*, 1993 ; Cahill *et al.*, 1994 ; Thompson Jr *et al.*, 1994 ; Christensen *et al.*, 1997 ; Dart *et al.*, 2002 ; Kennedy *et al.*, 2002 ; Borromeo *et al.*, 2005 ; Borromeo *et al.*, 2007). Les informations collectées lors de l'expérimentation 563 indiquent que de fortes concentrations de reGH sont présentes dans l'organisme de l'animal à des taux pouvant atteindre 180 ng.mL⁻¹ 1 h 30 après l'injection.

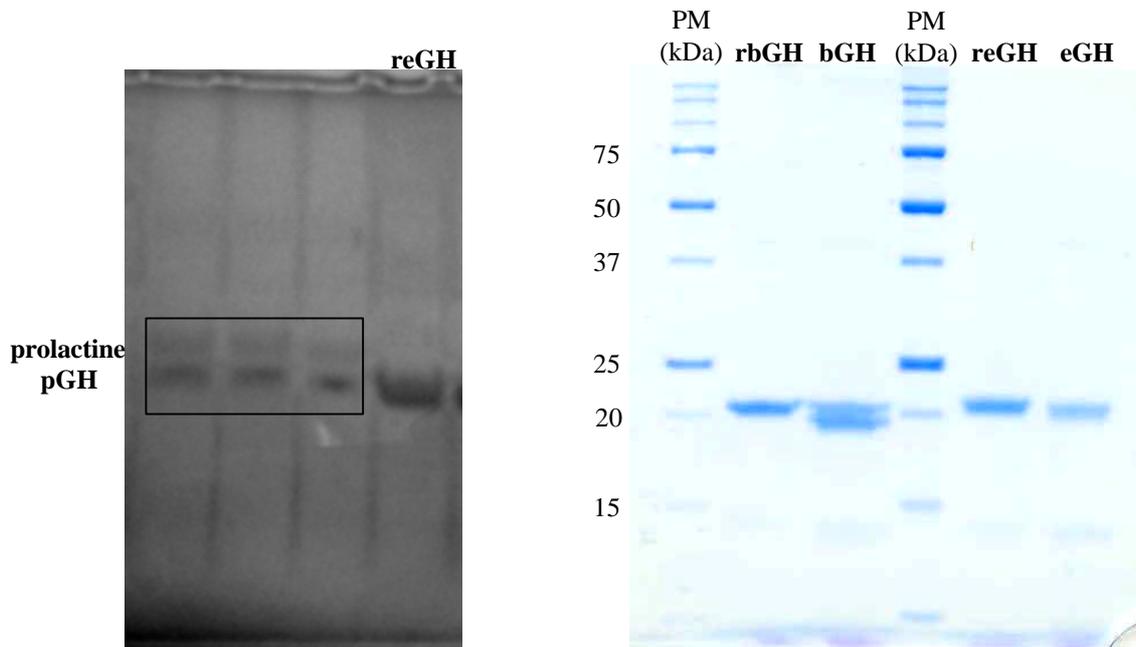


Figure III-18 : gels d'électrophorèse monodimensionnels (4-12%). Trois microgrammes de standards d'hormones de croissance naturelles et recombinantes équine, bovine ont été utilisés. Mise en évidence de la contamination de lots de pGH sigma par de la prolactine porcine. Coloration Biosafe coomassie blue.

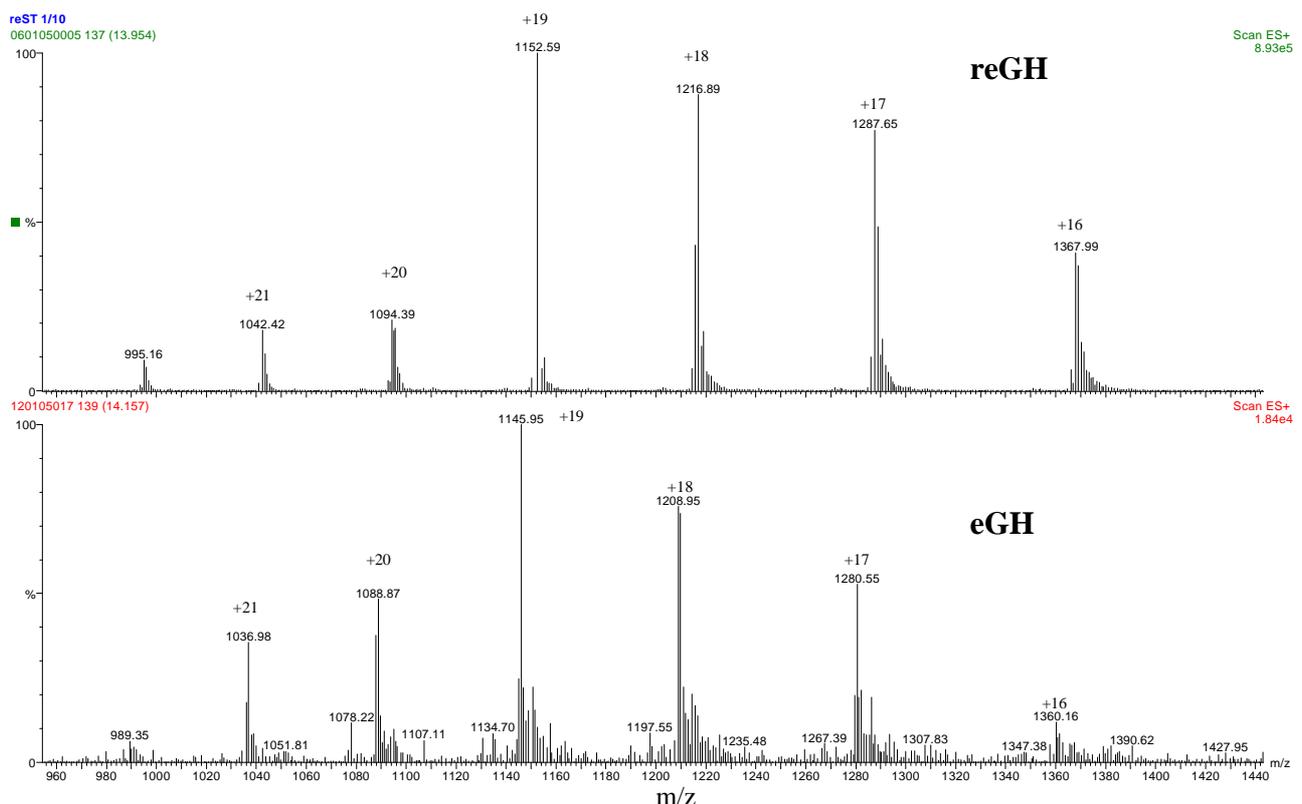


Figure III-19 : spectres de masse des enveloppes protéiques de l'hormone de croissance équine (eGH) et recombinante équine (reGH) obtenues après injection directe dans le spectromètre de masse en ionisation ESI-(+) et détection QqQ. Les multiples états de charge des enveloppes protéiques obtenues sont reportés sur la figure.

A trois heures, la concentration plasmatique de reGH enregistrée reste très élevée (160 ng.mL^{-1}) ce qui implique de refaire une expérimentation animale pour disposer d'échantillons correspondant à des temps de prélèvement plus éloignés de l'injection pour finir la cinétique d'élimination de la molécule avec retour des valeurs de concentration à une dizaine de ng.mL^{-1} . Il s'avère d'ores et déjà que la libération de la reGH dans l'organisme de l'animal est de plusieurs heures dans le plasma si l'administration de la molécule est réalisée par voie sous-cutanée.

3. PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE (MS)

3.1. Caractérisation des standards et mise au point des conditions d'acquisition

Au préalable du développement de la méthode d'extraction et de détection de l'hormone de croissance équine recombinante dans une matrice complexe, les standards ont été caractérisés en terme de pureté et de masses moléculaires. Pour se faire, l'électrophorèse E1D et la spectrométrie de masse ont été utilisées comme outils de choix pour répondre à la problématique.

3.1.1. *Les hormones entières*

3.1.1.1. Par électrophorèse 1D

Les hormones de croissance bovine et équine, formes recombinantes et endogènes, ont été caractérisées par électrophorèse E1D dans un gel d'acrylamide 4-12 % en utilisant des marqueurs de poids moléculaire (Figure III-18). La révélation du gel au « Biosafe coomassie blue » a permis de visualiser une bande très bien définie pour l'eGH, la reGH et la rbGH à la masse attendue de 22 kDa. Deux isoformes de bGH sont mis en évidence dans ce standard car deux bandes très proches sont très nettement observées à 22 kDa. La caractérisation du standard de l'hormone de croissance porcine « Sigma » montre deux bandes qui ne semblent pas provenir d'isoformes. L'une est à la masse attendue de 22 kDa et l'autre plus « lourde » vers 23-24 kDa est suspectée être de la prolactine (23 kDa).

3.1.1.2. Par spectrométrie de masse

La Figure III-19 présente les enveloppes protéiques de l'hormone de croissance équine (eGH) et recombinante équine (reGH) obtenues par injection directe dans la source, en mode ESI (+) et détection par un analyseur triple quadripolaire (QqQ).

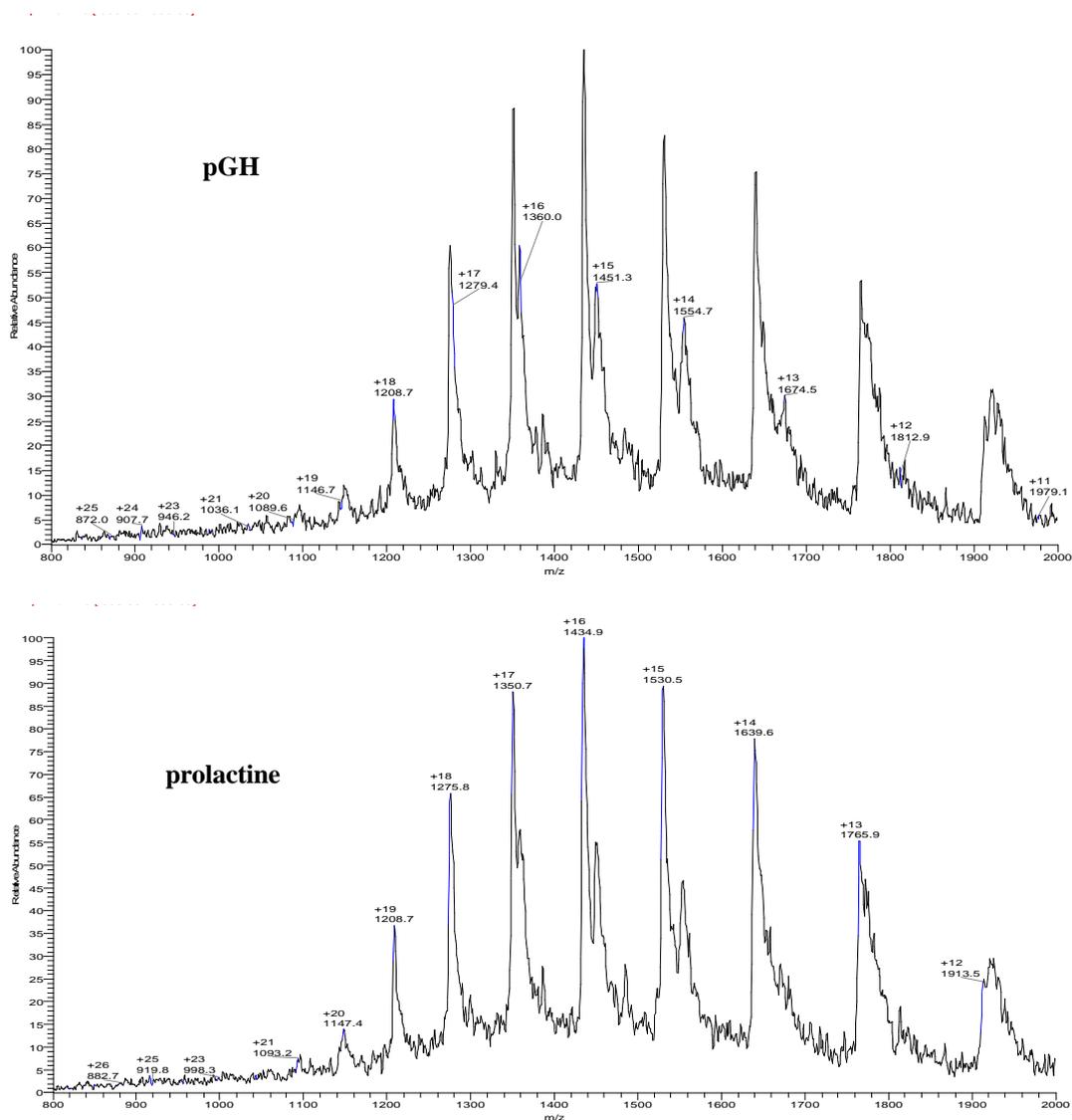


Figure III-20 : enveloppes protéiques de l'hormone de croissance porcine et de la prolactine contenues dans le mélange et obtenues après injection directe dans le spectromètre de masse en ionisation ESI-(+) et détection par un piège à ions 3D en mode « turboscan ». Les multiples états de charge des enveloppes protéiques sont reportés sur la figure.

Tableau III-5: masses théoriques et expérimentales des hormones de croissance équine et porcine, recombinante équine et mise en évidence de la prolactine porcine obtenues par spectrométrie de masse.

Spectromètre de masse	Hormones	Masse théorique (Da)	Masse expérimentale (Da)	Erreur sur la mesure (Da)
QqQ	eGH	21753	21756	3
	reGH	21884	21885	1
Trappe 3D	pGH	21727	21732	5
	pPrl	22947	22942	5

Sur la Figure III-20 sont représentées les enveloppes protéiques obtenues par analyse d'un lot de pGH (Sigma) de la prolactine porcine et de l'hormone de croissance porcine obtenues par injection directe dans la source, en mode ESI-(+) et détection par un piège à ions 3D. Pour ces quatre spectres de masse, environ 10 états de charges ($16 = n = 21$) ont été mis en évidence sur chacune des espèces polychargées mesurées. La déconvolution de ces différents états de charge est notée dans le Tableau III-5.

En conclusion :

Comme précédemment observé par Pinel (Pinel *et al.*, 2004) grâce à la spectrométrie de masse, 2 isoformes de bGH (21420 et 21810 Da) sont mises en évidence dans ce standard par le gel d'électrophorèse où deux bandes très proches ont été très nettement observées à 22 kDa. L'électrophorèse E1D et la spectrométrie de masse ont permis de conclure que les standards de reGH et d'eGH étaient purs, qu'ils n'étaient pas sous forme d'oligomères en solution et que les masses expérimentales étaient très proches de celles obtenues théoriquement. L'utilisation conjointe de ces techniques a permis de caractériser la présence de prolactine dans les lots d'hormones de croissance porcine provenant de chez Sigma. Les résultats obtenus sont en accord avec les spectres de masse ESI-(+) de la littérature concernant l'étude des hormones de croissance (Violand *et al.*, 1992 ; Bonnaire *et al.*, 1998 ; Rochut *et al.*, 2000 ; Secchi *et al.*, 2001 ; Blokland *et al.*, 2003 ; Pinel *et al.*, 2004).

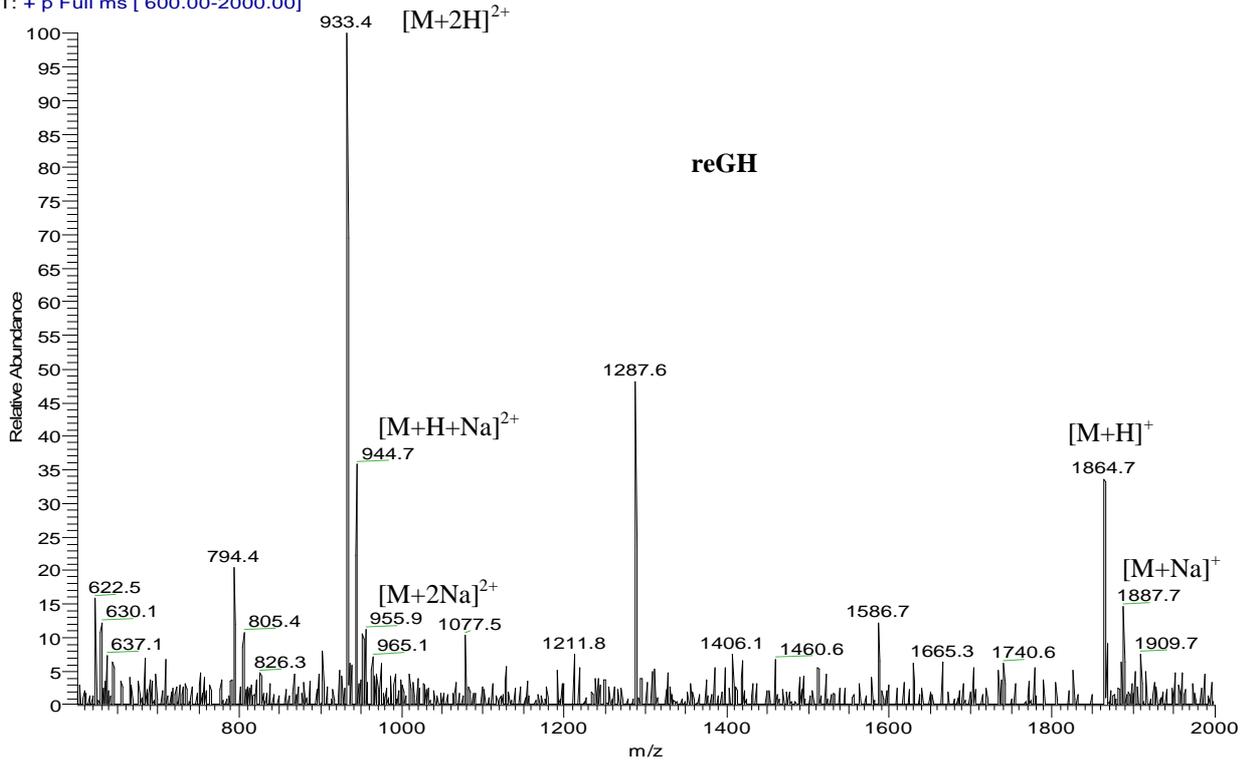
L'analyse directe des standards d'hormones de croissance a permis la discrimination des hormones naturelles et recombinantes quand leur composition en acides aminés est différente. Cependant, comme il est observé une division du signal en autant de polychargés (~ 10), il a été décidé par la suite de s'intéresser non plus à la détection de l'hormone entière mais à son peptide N-terminal caractéristique.

3.1.2. Les peptides

3.1.2.1. Les peptides utilisés comme standard

Pour mettre en place la stratégie analytique de détection du peptide N-terminal caractéristique de reGH, il a été nécessaire de faire synthétiser des peptides correspondants aux peptides tryptiques N-terminaux des hormones de croissance équine endogène et recombinante pour faciliter leur étude par spectrométrie de masse et disposer de standards de référence sans passer au préalable par des digestions enzymatiques fastidieuses et onéreuses.

reSTNT090305 #1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 2.36E8
T: + p Full ms [600.00-2000.00]



eSTNT090305 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.65E8
T: + p Full ms [200.00-2000.00]

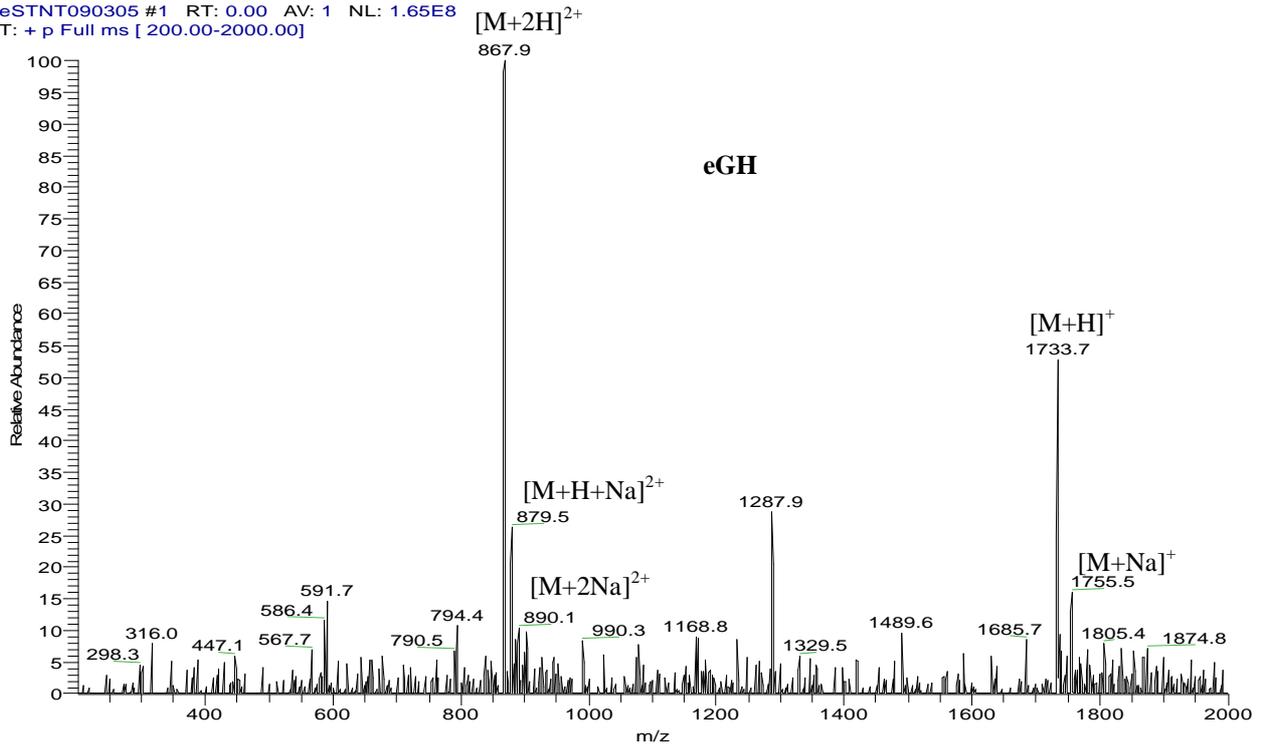


Figure III-21 : spectres de masse des peptides de synthèse correspondant aux peptides N-terminaux après hydrolyse trypsique d'eGH et de reGH obtenus après injection directe dans le spectromètre de masse en ionisation ESI (+) et détection par un piège à ions 3D. Les différents adduits sont reportés sur la figure.

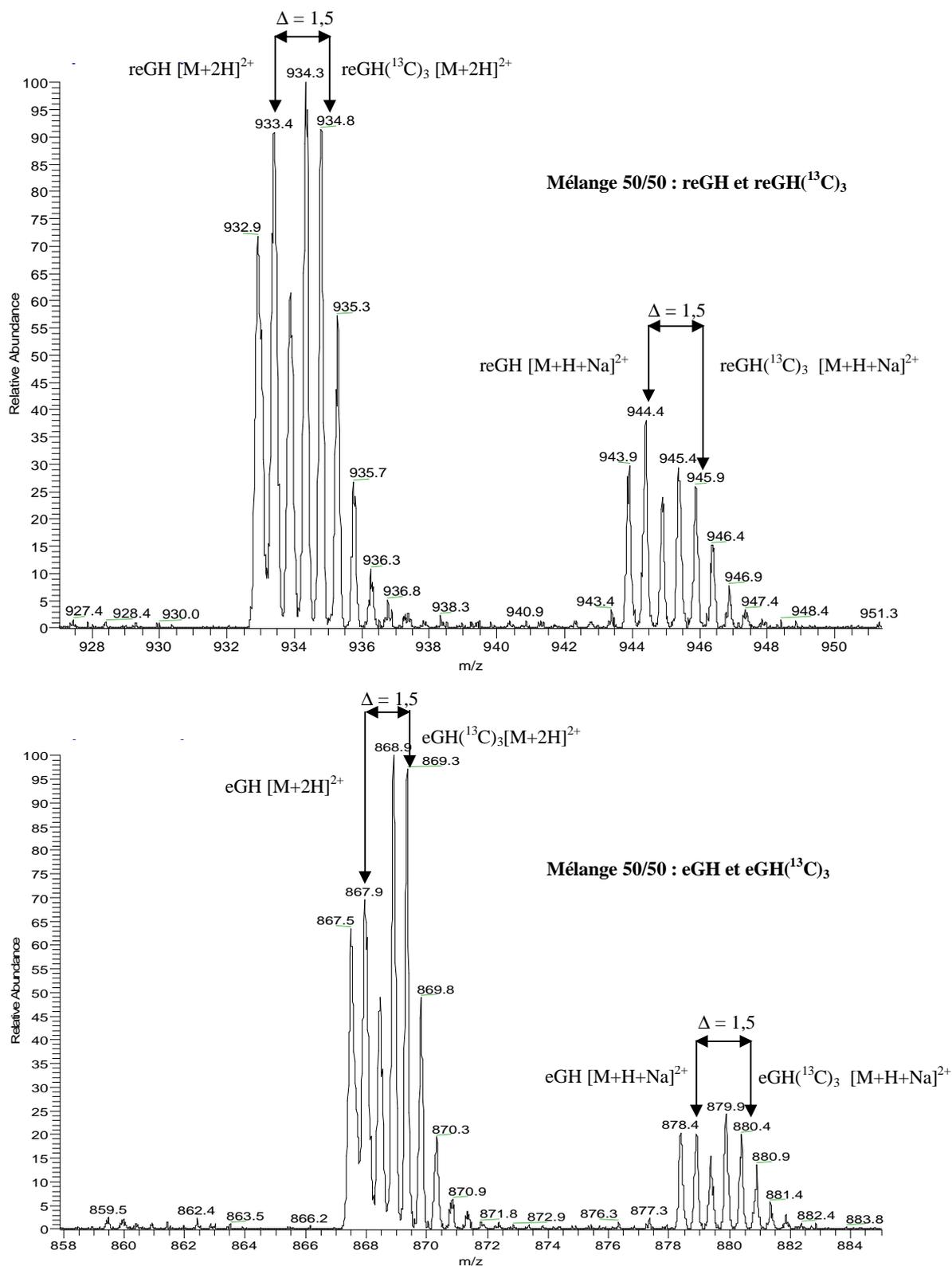


Figure III-22 : spectres de masse de mélange 50/50 de peptides N-terminaux de synthèse marqués et non marqués correspondant à l'hydrolyse trypsique d'eGH et de reGH obtenus après injection directe dans le spectromètre de masse en ionisation ESI(+) et détection par un piège à ions 3D en mode « zoomscan ». Les différents adduits sont reportés sur la figure.

Tableau III-6 : étalons externes du peptide N-terminal de reGH potentiellement utilisables en spectrométrie de masse. Présentation des différentes séquences choisies, leur nombre d'acide aminé et leur indice d'hydrophobicité selon l'indice de Kyte et Doolittle

Choix	Séquence du peptide	Nbr AA	Indice (Kyte et Doolittle)
N-term reGH	MFPAMPLSSLFANAVLR	17	17,6
N-term reGH(L ^{C13}) ₃	MFPAMP(L ^{C13})SS(L ^{C13})FANAV(L ^{C13})R	17	17,6
N-term eGH(L ^{C13}) ₃	FPAMP(L ^{C13})SS(L ^{C13})FANAV(L ^{C13})R	16	17,2
A	GGAMALSSLFANAVLR	16	17,1
B	FGAMGLSSLFANAVLR	16	18,5
C	MFGAMGLSSLFANAVLR	17	20
D	AAAMALSSLFANAVLR	16	21,5
E	MFAAMALSSLFANAVLR	17	24,4

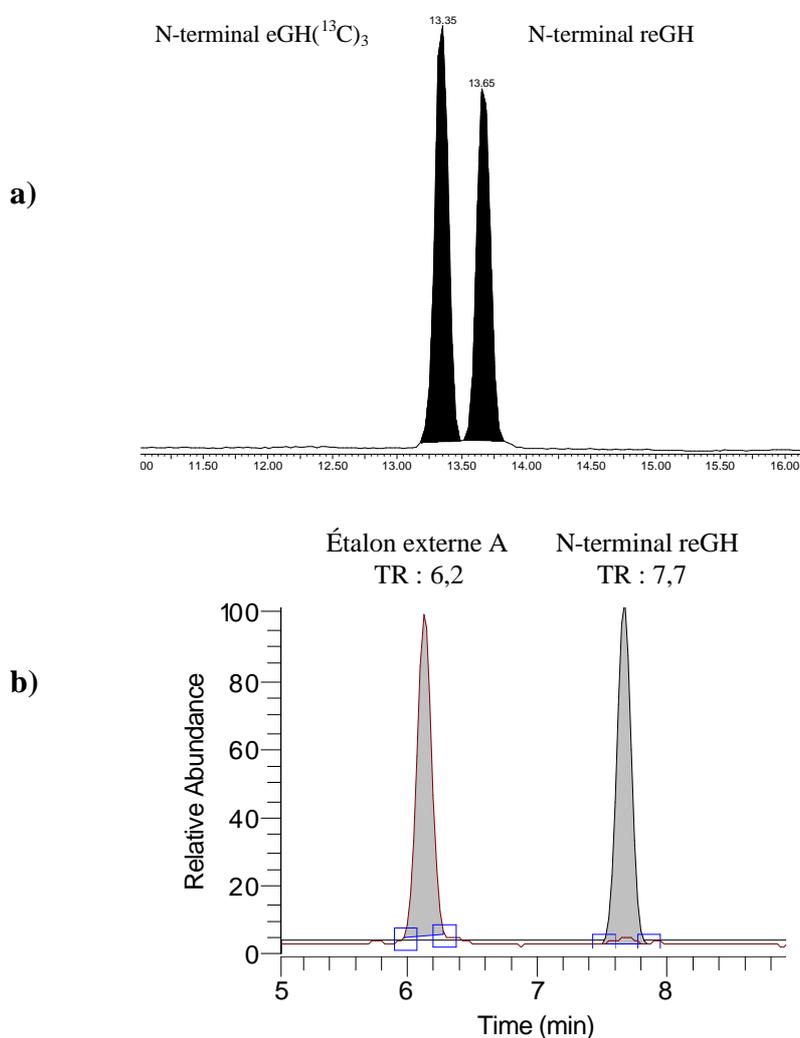


Figure III-23 : chromatogramme d'ions de la séparation par RP-HPLC et détection par spectrométrie de masse du peptide N-terminal de reGH (TR = 13,6 min) et de l'étalon externe eGH(¹³C)₃, en (a) et du peptide N-terminal de reGH (TR = 7,7 min) et de l'étalon externe A (TR = 6,2 min) en (b).

Le peptide N-terminal reGH (MFPAMPLSSLFANAVLR, 1864 Da) et le peptide N-terminal eGH (FPAMPLSSLFANAVLR, 1733 Da) ont donc été obtenus et caractérisés par injection directe dans le spectromètre de masse (ESI-+), piège à ions 3D), Figure III-21. Sur cette figure, les formes dichargées sont majoritaires, avec $[M+2H]^{2+}$ (m/z 933,4) pour le peptide N-terminal de reGH et $[M+2H]^{2+}$ (m/z 867,9) pour le peptide N-terminal d'eGH. La présence d'adduits sodium est montrée. L'ion de m/z 1287,6 est la conséquence d'une probable dissociation de la molécule dans la source car elle correspond à un fragment du peptide N-terminal. Il est intéressant de constater que la plupart des peptides obtenus par une digestion à la trypsine ont potentiellement 2 sites de protonation : la partie N-terminale et l'acide aminé basique en position C-terminale (lysine ou arginine). L'ionisation étant liée au nombre de sites basiques de la molécule, la forme $[M+2H]^{2+}$ est donc majoritaire en milieu acide (acide formique de l'éluant).

3.1.2.2. Les peptides utilisés comme étalons externes

Afin de s'assurer des performances en terme d'ionisation des peptides dans la source, il a été décidé d'utiliser des étalons externes appropriés. Les étalons externes envisagés sont présentés dans le Tableau III-6. Il s'agit soit de peptides marqués soit de peptides se rapprochant fortement en séquence et en hydrophobicité des peptides d'intérêt. Comme pour l'étude des petites molécules (stéroïdes), des peptides N-terminaux d'eGH et reGH marqués au ^{13}C sur leurs 3 leucines ont été synthétisés. Ces peptides ont été mélangés (50/50) à leurs homologues non marqués pour observer leur comportement en spectrométrie de masse (Figure III-22). Il apparaît que la résolution est difficile à obtenir à cause de l'abondance isotopique des différents éléments atomiques composants les peptides. Il a été nécessaire d'utiliser le mode « ZoomScan » pour obtenir la meilleure résolution. L'écart de masse de 2 Da entre le peptide N-terminal reGH et le N-terminal reGH(^{13}C)₃ est trop faible pour être facilement résolu avec le piège à ions 3D surtout lorsqu'il s'agit de travailler avec les espèces dichargées des peptides (formes majoritaires). L'observation pour les peptides N-terminaux eGH et eGH(^{13}C)₃ est identique. L'emploi de peptides marqués aux leucines ^{13}C ne semble pas convenir pour notre étude car il y a un trop grand risque de faux positifs. Les premiers essais de mise au point ont néanmoins été réalisés en utilisant l'eGH(^{13}C)₃ comme étalon externe du peptide N-terminal de reGH (Figure III-23). Par la suite, devant l'intérêt suscité par la détection potentielle de l'hormone endogène, d'autres étalons externes, beaucoup plus éloignés en séquence du peptide N-terminal de reGH ont été envisagés.

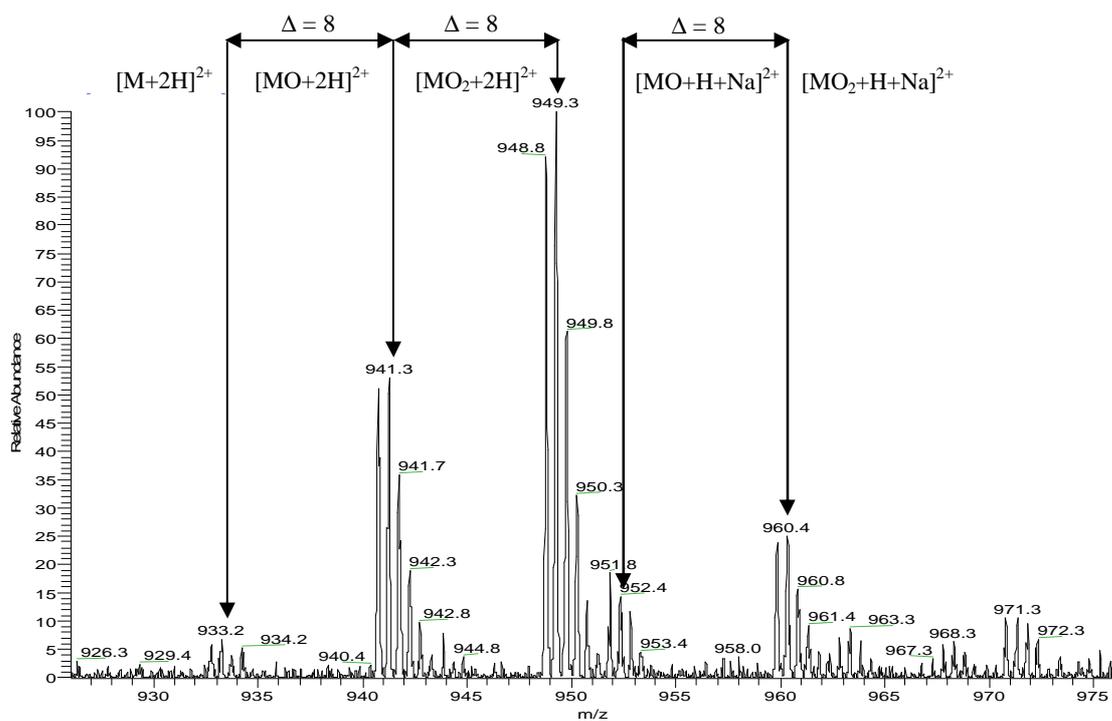
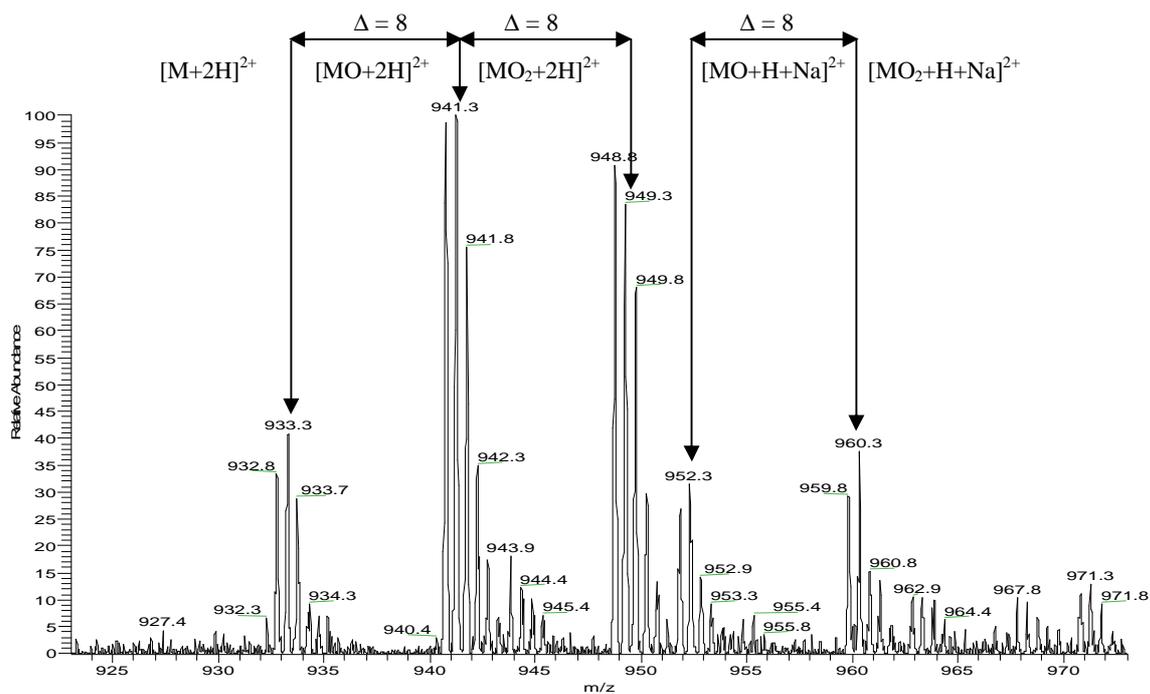


Figure III-24 : spectres de masse de l'oxydation du peptide N-terminal reGH par H₂O₂ au bout de 2 min et 15 min de contact. Résultats obtenus après injection directe dans le spectromètre de masse en ionisation ESI (+) et détection par un piège à ions 3D en mode zoomscan. Les différentes formes sont reportées sur la figure.

Ces peptides ont été choisis pour leur taille et leur hydrophobicité proche de celle du peptide N-terminal de reGH afin de garantir un comportement chromatographique lors de la LC-MS/MS identique sur colonne analytique de phase inverse C₄.

En comparant les séquences entre elles selon l'indice d'hydrophobicité des peptides de Kyte et Doolittle (Kyte et Doolittle, 1982) (plus la valeur est élevée, plus le peptide est hydrophobe), le choix du peptide A s'est imposé pour deux raisons : un comportement en phase inverse très proche théoriquement entre l'étalon externe et l'analyte (17,1 et 17,6) et des performances de solubilisation accrues (en synthèse peptidique et en utilisation au laboratoire). L'écart de temps de rétention de 1,5 minutes entre ces deux composés en couplage LC/MS a confirmé ces hypothèses théoriques (Figure III-23).

3.1.2.3. Mise en évidence de l'oxydation des méthionines du peptide N-terminal reGH

Les protéines et les peptides étant des molécules fragiles, à savoir modifiables par des facteurs physico-chimiques environnant (pH, lumière, oxydation), l'objectif de cet essai devait nous permettre de savoir s'il était relativement facile en présence d'oxygène d'oxyder les méthionines et par la suite d'en définir les masses des composés oxydés. En effet, en spectrométrie de masse, la sensibilité et la spécificité de la méthode peuvent être la plus exceptionnelle possible mais si au cours du processus d'extraction et de concentration de la molécule une modification chimique intervient, la détection de l'ion à la masse attendue ne pourra être réalisée car l'ion aura subi un décalage en masse. L'inconvénient avec les réactions d'oxydation est qu'elles induisent des modifications importantes en masse, + 16 pour une oxydation et +32 pour deux. Ces écarts de masse ne peuvent pas être pris en compte lors de la détection de la molécule d'intérêt en ouvrant davantage la fenêtre d'acquisition, à moins de les rechercher plus spécifiquement. La Figure III-24 présente les résultats de l'oxydation du peptide N-terminal par H₂O₂ détectée par spectrométrie de masse à 2 minutes de réaction puis à 15 minutes. Dès 2 minutes, l'oxydation des méthionines en méthionines sulfoxides est visible, de la forme non oxydée est détectée mais les formes monoxydées et dioxydées sont déjà bien présentes. A 15 minutes, la forme non oxydée n'est quasiment plus détectée et la forme majoritaire tend à devenir l'espèce dioxydée. Le Tableau III-7 présente l'ensemble des masses observées. Lors des premières étapes du développement de la méthode, les ions m/z 941 et m/z 949, correspondant respectivement aux formes dichargées monoxydées et dioxydées ont été inscrits dans la méthode de détection des ions du spectromètre de masse au même titre que l'ion dichargé m/z 933,5 du peptide N-terminal reGH. Ces ions sont apparus quelques fois après extraction sur ajout de plasma mais toujours présents en quantité très limitée.

Tableau III-7 : rapport m/z des formes oxydées du peptide N-terminal reGH

Formes dichargées	Masse monoisotopique			Masse moyenne		
	théorique	expérimentale	écart (m/z)	théorique	expérimentale	écart (m/z)
[M+2H] ²⁺	933,0	932,8	0,2	933,5	933,3	0,2
[M+2H] ²⁺ 1 oxydation	941,0	940,8	0,2	941,5	941,3	0,2
[M+2H] ²⁺ 2 oxydations	949,0	948,8	0,2	949,5	949,3	0,2
[M+H+Na] ²⁺	944,0	943,9	0,1	944,5	944,3	0,2
[M+H+Na] ²⁺ 1 oxydation	952,0	951,3	0,7	952,5	952,3	0,2
[M+H+Na] ²⁺ 2 oxydations	960,0	959,8	0,2	960,5	960,3	0,2

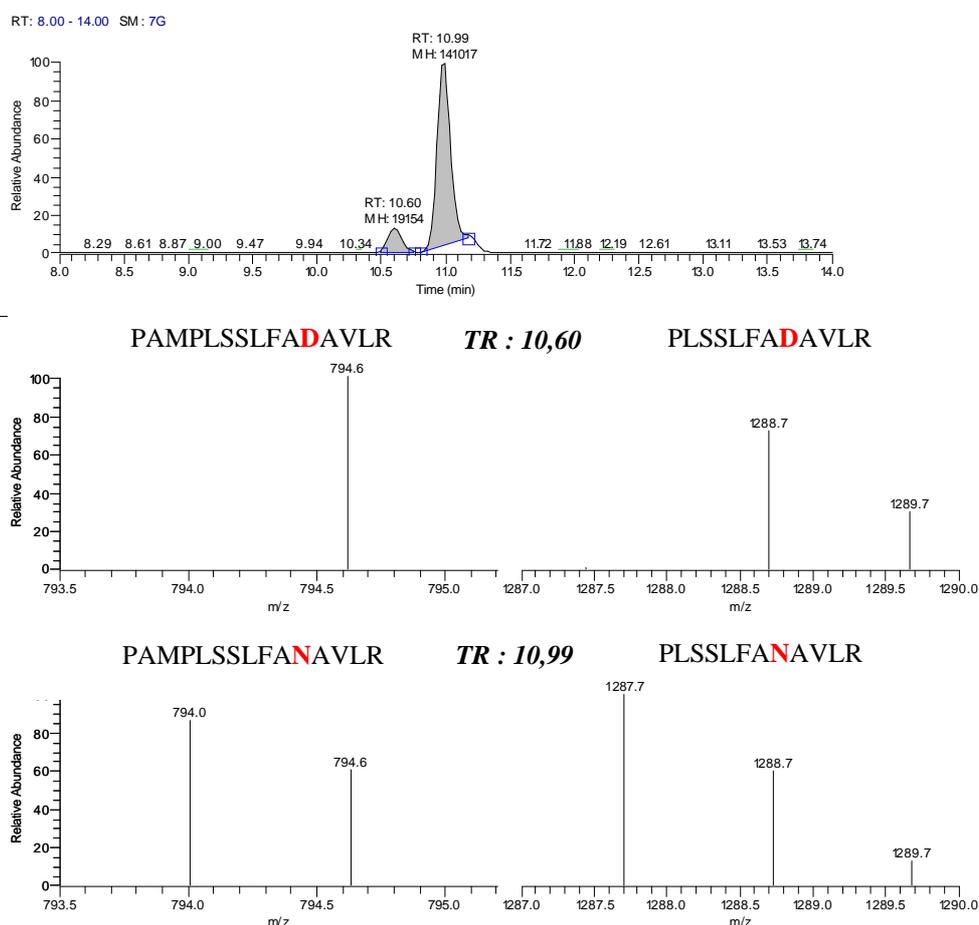


Figure III-25 : RP-HPLC/MS/MS du peptide N-terminal caractéristique de reGH obtenu après hydrolyse trypsique d'un standard vieilli pendant 4 mois à 4°C à pH 7,9. Gradient composé d'H₂O/ACN 0,2 % AF au moyen d'une colonne C4, 300Å, 2x250 mm, 5 µm couplé à un piège à ions linéaire (LTQ XL). 2 transitions de m/z 933,5 suivies en balayant entre m/z 793,5 à 795,5 et m/z 1287 à 1290

3.1.2.4. Mise en évidence de la désamidation de l'asparagine en position 13

Toujours afin de se prémunir de modifications chimiques pouvant nuire à la détection de la molécule de reGH sur matrice, celle-ci a été conservée pendant 4 mois à 4°C en tampon pH 7,9. L'analyse par RP-HPLC/MS/MS du peptide N-terminal correspondant est présentée Figure III-25. L'isolement dans le piège à ions linéaire a été spécifié avec une fenêtre de m/z 3 centrée sur l'ion de m/z 933,5, ceci permettant de faire entrer tous les ions entre m/z 932 et 935 et de les fragmenter. Le chromatogramme des ions détectés en MS/MS permet d'observer deux pics, un au TR de 10,60 min et l'autre au TR de 10,99 min. L'analyse des ions fils extraits du chromatogramme fournit dans le premier pic des ions dichargés de masse monoisotopique respectivement de m/z 794,6 et 794,0 et dans le second des ions monochargés de m/z 1288,7 et 1287,7. Dans les deux cas, 1 Da d'écart entre les masses des deux ions lorsqu'ils sont remis à un état de charge de un est observé. La seule possibilité pour expliquer cette différence de 1 Da est la désamidation de l'asparagine, en position 13, en acide aspartique. De plus, le peptide devenu un peu plus polaire est donc élué quelques secondes avant la forme asparagine. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature (Riggin *et al.*, 1987 ; Karlsson *et al.*, 1999) où les auteurs ont montré que les formes désamidés de hGH étaient éluées quelques secondes avant la forme dite « normale » sur phase inverse.

3.1.3. MS/MS appliquée au peptide N-terminal de reGH

En CID basse énergie réalisée par un triple quadripôle ou un piège à ions, la charge positive se trouve généralement sur le squelette peptidique pour produire majoritairement des ions b et y comme indiqué Figure III-26. Il existe souvent des pics correspondants à la perte d'un NH₃ (-17 Da) nommés b* et y* et/ou à une perte d'une molécule d'eau (-18 Da) nommés b° et y°. Dans ce type de MS/MS, il se forme rarement des ions satellites correspondant au clivage des chaînes latérales d'acides aminés. Le Tableau III-8 résume les différents ions fragments théoriquement possibles de distinguer en réalisant la MS/MS du peptide N-terminal de reGH.

Un test de différentes énergies de collision a été fait pour obtenir la plus grande sensibilité de détection des ions fils du peptide N-terminal caractéristique. Des énergies de 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 eV ont été appliquées. Le meilleur résultat a été obtenu pour une énergie de collision de 45 eV. L'acquisition réalisée sur 1 min de la fragmentation du peptide à 45 eV fournit le spectre de masse de la Figure III-27. L'utilisation du logiciel PepSeq a permis de confirmer l'attribution des acides aminés correspondants à la séquence du peptide.

Une étude structurale de la fragmentation du peptide N-terminal a permis d'identifier les ions majoritaires. L'ion de m/z 933,3 est le peptide N-terminal sous sa forme dichargée, l'ion de m/z 794 (y_{15}^{2+}) est un fragment dichargé obtenu lors de la fragmentation devant la première proline et l'ion de m/z 1288 (y_{12}) est un fragment monochargé résultant de la fragmentation avant la deuxième proline. Les structures de ces ions sont présentées Figure III-28.

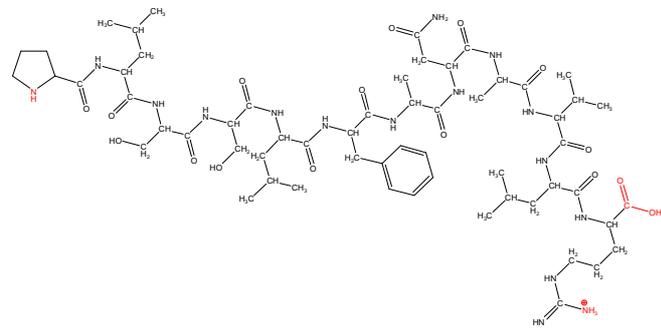
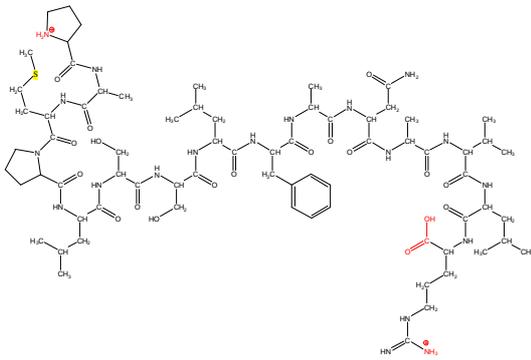
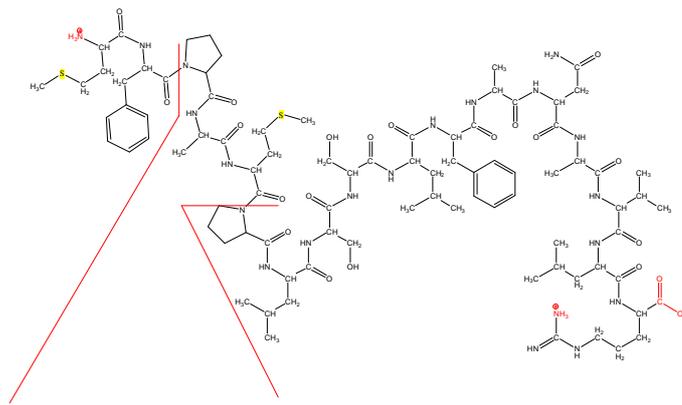
3.1.4. *LC/MS/MS appliquée au peptide N-terminal de reGH*

Lors de la fragmentation du peptide N-terminal à 45 eV, trois ions majoritaires ont été définis et le suivi de trois transitions correspondantes a donc été effectué en couplage RP-HPLC/MS/MS. Les transitions d'ions choisies pour la spécificité du peptide N-terminal recombinant sont : $933,3 > 933,3$; $933,3 > 794,0$ et $933,3 > 1288,7$. La Figure III-29 représente le chromatogramme d'ions des 3 transitions suivies lors de la fragmentation du peptide standard N-terminal (a) et après digestion de l'hormone de croissance équine recombinante par la trypsine (b). Sur ces figures, il peut être constaté que l'utilisation d'une énergie de fragmentation de 45 eV permet d'obtenir des intensités de transitions équivalentes (2915, 2090, 2805) pour la fragmentation du peptide standard et de (501, 411, 575) pour le produit de digestion enzymatique. Les rapports d'ions étant constants (Tableau III-9), l'utilisation de ces transitions peut donc être un critère utilisable pour confirmer la présence du peptide N-terminal caractéristique de reGH dans l'échantillon à analyser. Une optimisation des transitions pourra être effectuée en choisissant la meilleure énergie de collision pour chacune d'entre elles dans l'optique d'avoir les pics les plus abondants avec des rapports S/N les plus élevés.

3.1.5. *Tests de sensibilité des spectromètres de masse utilisés*

Au cours de ce travail de mise au point, différents spectromètres de masse ont été utilisés et chacun d'eux a été testé pour définir leur limite de sensibilité sur standard. Le Quattro (QqQ) et le LCQ Deca (piège à ions) ont montré des sensibilités proche, de l'ordre de 20 pg (10 fmol) de peptide N-terminal injecté. Le LTQ XL (piège à ions linéaire) a permis d'obtenir la limite de sensibilité la plus basse : 1 pg injecté (500 amol) (Figure III-30). La mesure sur LTQ-Orbitrap n'a pas permis d'augmenter cette sensibilité, l'instrument étant davantage dédié à de l'élucidation structurale plutôt qu'à des sensibilités très élevées. Des essais sur TSQ Quantum Ultra (QqQ) ont montré des résultats pouvant laisser espérer une sensibilité inférieure à 1 pg injecté. Le test de sensibilité n'a pu être réalisé car le travail d'optimisation au sein du laboratoire de Thermo Scientific (Les Ulis, France) était spécialement dédié à de la détection de reGH sur ajouts dans le plasma et échantillons d'expérimentation.

Peptide N-terminal $(M+2H)^{2+}$: 933,3



Fragment y_{15} $(M+2H)^{2+}$: 794

Fragment y_{12} $(M+H)^+$: 1288

Figure III-28 : structure des ions fragments majoritaires du peptide N-terminal de reGH. Mise en évidence des ions y_{15} et y_{12} .

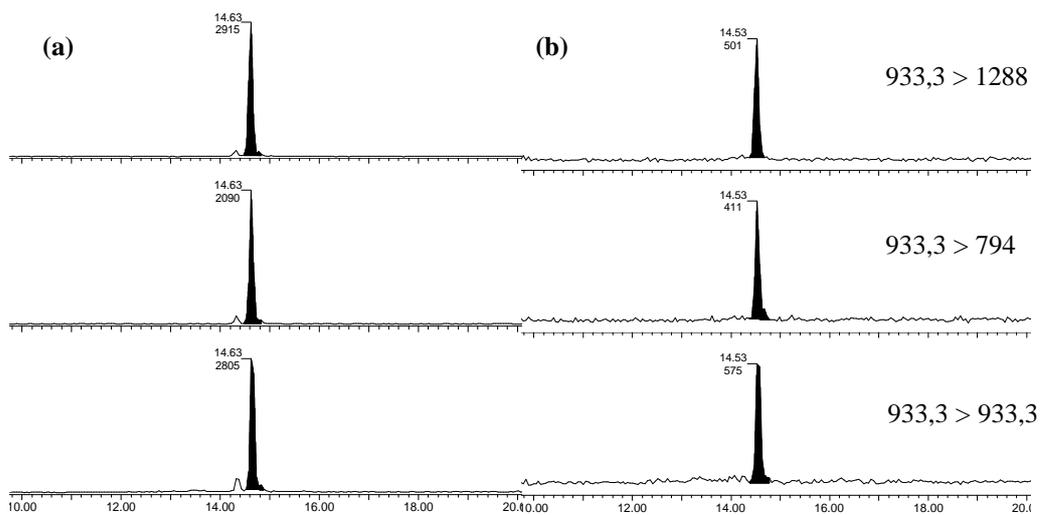


Figure III-29 : chromatogramme d'ions représentant 3 transitions suivies après fragmentation du peptide standard N-terminal à 45 eV en (a) suivi du standard N-terminal (14,63 min), en (b) suivi du peptide après trypsinolyse de reGH (14,53 min).

Tableau III-9 : tableau des rapports d'ions après LC-MS/MS de l'ion 933

	Transitions suivies	Rapports d'ions	Intervalle à 20 %	Validité
Standard N-terminal	1- 933>933 : 2805	2/1 : 0,745 3/1 : 1,039	0,596<I<0,894 0,832<I<1,247	oui
	2- 933>794 : 2090			
	3- 933>1288 : 2915			
N-terminal après trypsinolyse de l'hormone	1- 933>933 : 575	2/1 : 0,714 3/1 : 0,871	0,572<I<0,856 0,697<I<1,045	oui
	2- 933>794 : 411			
	3- 933>1288 : 501			

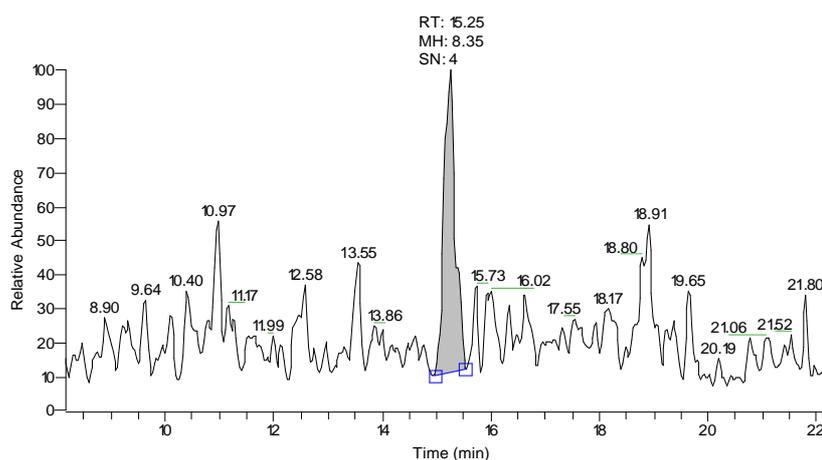


Figure III-30 : chromatogramme d'ions représentant 1 pg de peptide N-terminal de reGH standard détecté par RP-HPLC/MS/MS au moyen d'un piège à ions linéaire (LTQ XL). Acquisition en mode product scan de l'ion m/z 933,3 et reconstruction du chromatogramme d'ions avec les ions m/z 578,3, m/z 794,5, m/z 1287,5, m/z 1288,5.

En conclusion :

Cette étape de mise au point a permis d'établir les conditions optimales permettant de caractériser les molécules d'hormones de croissance équine et recombinante équine grâce à la déconvolution de leur spectre de masse et d'identifier que le lot d'hormone de croissance porcine Sigma était contaminé par de la prolactine. Il a été montré que l'intensité maximale du signal obtenu pour une protéine était divisée en autant d'états polyschargés formant l'enveloppe protéique. Pour cette raison et dans l'objectif de pouvoir détecter ces molécules présentes à l'état de trace dans des échantillons biologiques complexes, il a été décidé d'identifier ces composés par leur peptide N-terminal caractéristique, considéré comme un élément nécessaire et suffisant à la différenciation de ces molécules.

L'analyse des peptides N-terminaux de synthèse, représentant les peptides N-terminaux obtenus après une hydrolyse trypsique des hormones de croissance a montré par injection directe dans la source qu'il y avait formation d'ions $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+2H]^{2+}$, ion mixte $[M+H+Na]^{2+}$ et dans une moindre mesure de $[M+2Na]^{2+}$. De plus, il est à noter l'existence potentielle d'autres formes du peptide N-terminal recombinant à savoir monooxydée ($[MO+2H]^{2+}$) et dioxydée ($[MO_2+2H]^{2+}$) des méthionines et la désamidation possible de l'asparagine 13. La mise en évidence de toutes ces modifications devra permettre de suivre le peptide N-terminal lors de la purification, même si au cours du processus il subit des modifications chimiques.

Le peptide N-terminal reGH de synthèse marqué au ^{13}C sur les leucines n'est pas assez éloigné en masse du peptide N-terminal provenant de l'hydrolyse trypsique de l'hormone équine recombinante. Il pourrait y avoir des problèmes de résolution lors de la détection car sans le mode « ZoomScan », les masses (m/z) sont confondues. C'est pourquoi, lors du développement de la méthode, l'eGH(^{13}C)₃ a tout d'abord été utilisée. Puis dans une optique plus élargie pour envisager la détection de l'hormone endogène, l'étalon externe a été remplacé par un peptide synthétique proche en séquence des acides aminés du peptide d'intérêt.

La fragmentation du peptide par MS/MS a permis d'obtenir deux ions (m/z 1288 et m/z 794) majoritaires et de rapport constant dont la structure a été élucidée. Les nombreux essais de tests de sensibilité sur les différents appareils mis à disposition ont permis de conclure que le spectromètre de masse disponible le plus sensible était le piège à ions linéaire avec une limite de sensibilité estimée à 1 pg de peptide N-terminal.

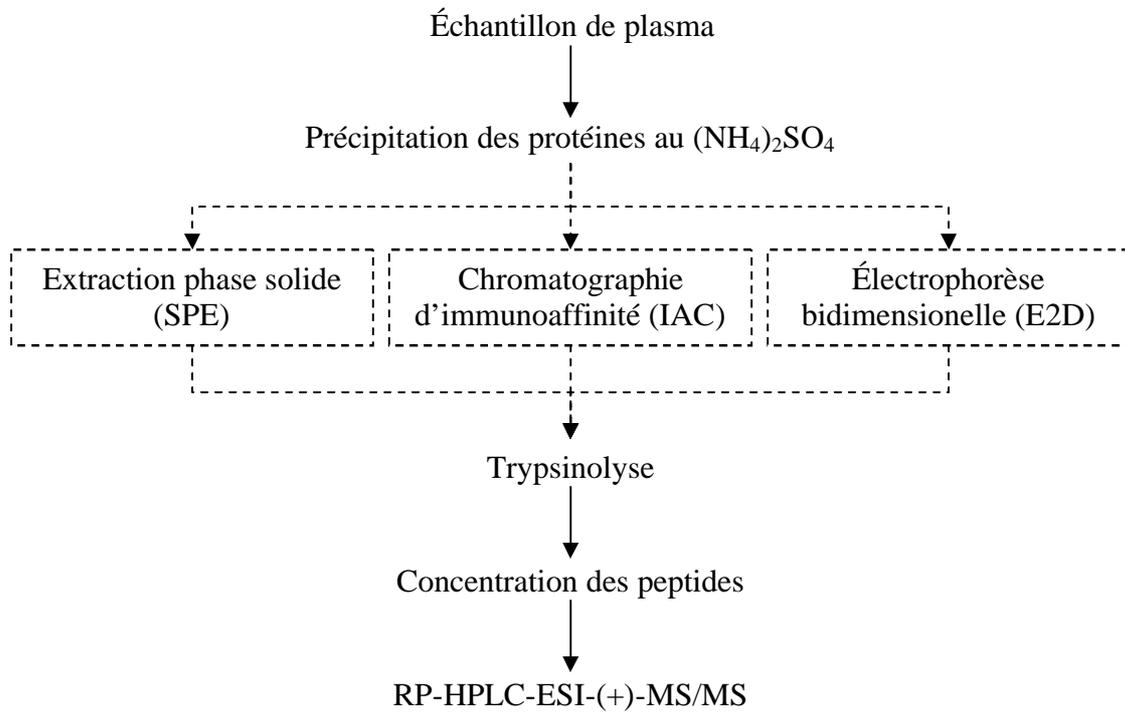


Figure III-31 : schéma du principe de la stratégie analytique envisagée pour la détection directe de reGH dans le plasma au moyen de son peptide N-terminal caractéristique.

3.2. Stratégie analytique envisagée pour la détection directe de reGH dans le plasma

Au début du travail de thèse, les grandes lignes d'une stratégie analytique ont été dessinées pour extraire et purifier la molécule d'hormone de croissance équine recombinante du plasma avant de pouvoir la caractériser *via* son peptide N-terminal par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Le Figure III-31 présente la stratégie analytique telle qu'envisagée au début du travail de thèse.

Après une étape d'extraction de reGH du plasma par une précipitation sélective au sulfate d'ammonium (au point isoélectrique de l'hormone) trois étapes différentes ont été envisagées en parallèle pour obtenir la meilleure purification permettant de détecter la molécule présente à l'état de trace ($\mu\text{g.L}^{-1}$). Tout d'abord, le développement de la SPE en phase inverse, technologie jusqu'à présent jamais rapportée pour la purification des hormones de croissance, devait permettre d'isoler la reGH des protéines contaminantes du plasma au moyen d'une cartouche appropriée et d'une élution optimisée avant d'obtenir les peptides tryptiques et l'identification du peptide N-terminal d'intérêt par LC-MS/MS. En parallèle, l'immunoaffinité devait permettre de capturer de manière spécifique les traces de reGH dans le plasma au moyen d'anticorps polyclonaux avant de subir l'hydrolyse enzymatique et l'identification du peptide N-terminal par LC-MS/MS. Enfin, une approche protéomique devait permettre grâce à la forte résolution de l'électrophorèse bidimensionnelle de pouvoir obtenir un spot bien résolu de reGH, l'exciser, puis grâce à une digestion « in-gel » d'obtenir les informations de LC-MS/MS du peptide N-terminal de reGH.

Chacune de ces étapes a été mise au point et évaluée au regard des objectifs de la détection de reGH dans le plasma présent à l'état de trace. Les résultats de l'optimisation de chacune des étapes clés de la stratégie analytique seront discutés.

3.3. Optimisation des différentes étapes du protocole de purification de reGH dans le plasma

3.3.1. Détermination des conditions de précipitation au sulfate d'ammonium

Afin de définir la quantité optimale de sulfate d'ammonium à ajouter dans l'échantillon de plasma pour obtenir la détection la plus appropriée en terme de sensibilité de reGH, un pool de plasma a été constitué dans lequel une concentration fixe de reGH (50 ng.mL^{-1}) a été ajoutée.

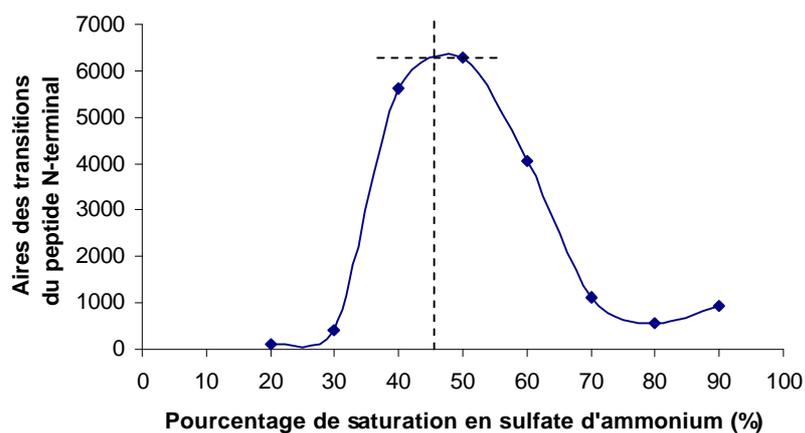


Figure III-32 : courbe représentant l'effet de différents pourcentages de saturation en sulfate d'ammonium sur la détection de reGH dans le plasma avec une prise d'essai de 3 mL à une concentration de $[reGH] = 50 \text{ ng.mL}^{-1}$. Détection du peptide N-terminal de reGH par spectrométrie de masse en mode product scan (LTQ XL).

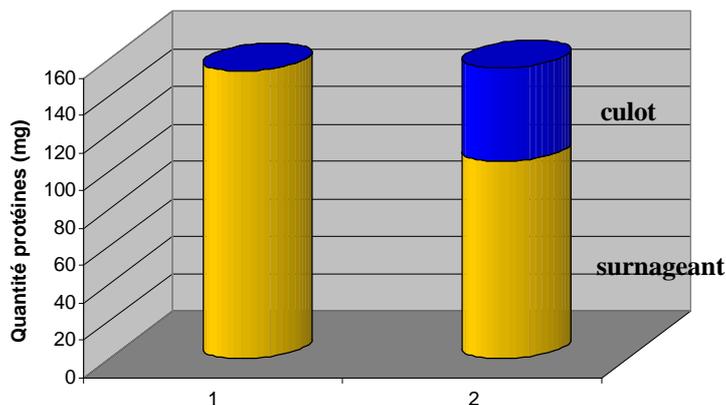


Figure III-33 : dosage des protéines contenue dans 2,5 mL de plasma servant de prise d'essai (1), après 50 % de saturation en sulfate d'ammonium, le culot de protéines et celles contenues dans le surnageant sont dosées par la méthode de Lowry.

Tableau III-10 : nom, caractéristiques et rendements obtenus à partir des différentes cartouches SPE testées pour mettre au point la méthode de détection directe de reGH dans le plasma

Nom	Capacité	Type de phase	Porosité (Å)	Rendements (%)
SDSC18	500 mg/6 mL	C ₁₈	60	1
Widepore C4	500 mg/6 mL	C ₄	275	25
XWP	500 mg/6 mL	polymère	500	-
WC4	500 mg/6 mL	C ₄	300	> 50
BondElut EWP	500 mg/6 mL	C ₁₈	500	25
LMS	100 mg/3 mL	polymère	300	-
PPL	100 mg/3 mL	polymère	150	-

Un volume croissant de solution de sulfate d'ammonium saturée ajustée à pH 7 a ensuite été ajouté aux 3 mL de prise d'essai de plasma (ajustée à pH 6,9) pour obtenir des saturations en sel de 20 % à 90 %. La courbe Figure III-32, montre l'impact des concentrations en sel sur l'intensité de détection du peptide N-terminal de reGH dans le plasma obtenue après une SPE C₄, trypsinolyse de reGH et détection du peptide N-terminal par LC-MS/MS.

Le point maximum de détection est atteint pour environ 50 % de saturation en sulfate d'ammonium avec un plateau estimé entre 42 et 50 %. Cette concentration (50 %), bien que permettant la meilleure détection de reGH dans le plasma, est jugée trop proche de la fin du plateau et pourrait ne pas donner des résultats reproductibles si de légères variations dans la concentration en sel (55 à 60 %) subvenaient lors de cette première étape du traitement de l'échantillon. C'est pourquoi, le pourcentage optimal de travail est fixé à 45 % de saturation en sulfate d'ammonium. En effet, à ce pourcentage, des variations limitées dans la quantité de sulfate d'ammonium ajoutée à l'échantillon ne devraient pas nuire à la détection. Ce pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium est cohérent avec les données de la littérature où à pH 7,2 de la bGH a été précipitée à 45 % de saturation à partir d'hypophysés bovines (Spitsberg, 1987), de l'hGH a été précipitée à 50 % pH 7 dans des extraits d'*E. coli* (de Oliveira *et al.*, 1999) ou dernièrement de la rpGH précipitée à 45 % à pH 7,4 dans des extraits de *Pichia pastoris* (Ouyang *et al.*, 2003).

Le dosage des protéines par la méthode de Lowry a montré qu'un échantillon de 2,5 mL de plasma contenait 153 mg de protéines. Après une précipitation à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium, le culot contient 50 mg de protéine et 105 mg de protéines sont mesurées dans le surnageant. La Figure III-33 présente le résultat de ce dosage. Il apparaît clairement que la précipitation des protéines contenues dans le plasma à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium permet d'éliminer les 2/3 des protéines contaminantes. A 45 % de saturation, le dosage n'a pas été réalisé, mais il est fort probable que davantage de protéines sont éliminées dans le surnageant.

3.3.2. *Évaluation de l'approche SPE dans la stratégie analytique*

Lors de la mise au point du protocole d'extraction de reGH dans le plasma, différentes cartouches SPE « phase inverse » ont été comparées (Tableau II-8). Les évaluations de ces cartouches ont été réalisées sur des extraits obtenus après une précipitation au sulfate d'ammonium dans le plasma avec un ajout à 100 ng.mL⁻¹. Les essais initiaux avec de la reGH dans du tampon avaient donné des résultats moins intéressants, sûrement liés à l'exacerbation de l'hydrophobicité des protéines en présence de fortes concentrations en sels.

SRM : 933,5 > 933,5

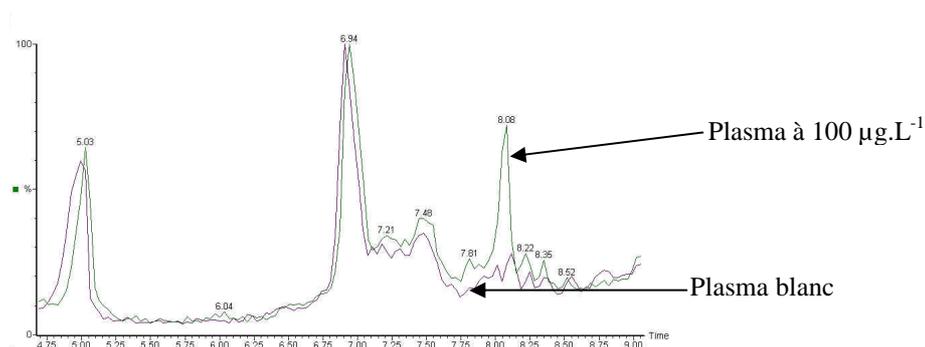


Figure III-34 : chromatogrammes d'ions du peptide N-terminal de reGH, détecté dans un ajout de plasma à 100 µg.L⁻¹ de reGH après une précipitation à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium, une SPE C4 et une trypsinolyse avant LC-MS (QqQ).

SRM : 933,5 > 794

933,5 > 1288

CRM : 933,5 > 794 > 1288

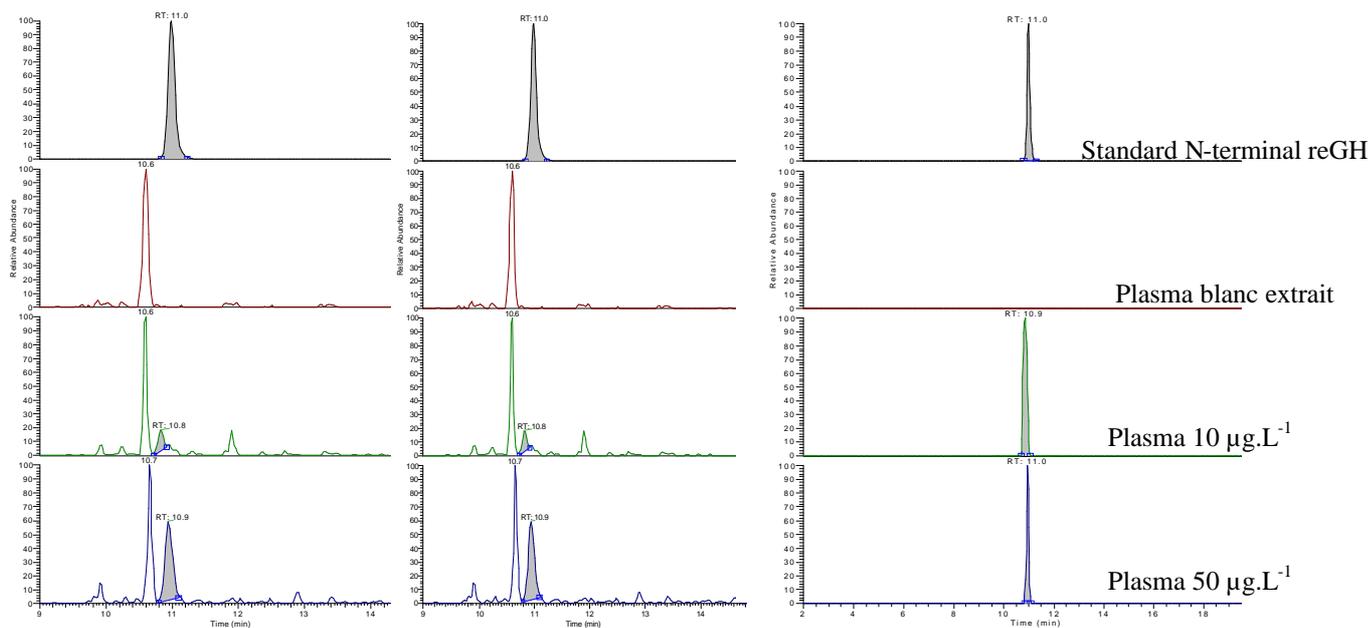


Figure III-35 : chromatogrammes d'ions représentant la détection du peptide N-terminal de reGH après précipitation à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium, SPE C4 et trypsinolyse d'un ajout dans le plasma de reGH à 10 et 50 µg.L⁻¹. Détection de deux transitions en mode Selected Reaction Monitoring (SRM) et une fragmentation en série en mode Consecutive Reaction Monitoring (CRM).

Les résultats médiocres obtenus avec les cartouches SDSC18 sont très probablement liés à la faible porosité de ces cartouches (60 Å). En effet, il est communément admis (Blevins *et al.*, 1993) que les protéines de 15 à 20 kDa ont un volume hydrodynamique trop important pour pénétrer convenablement dans une phase ayant une porosité inférieure à 100 Å, et pour cette raison, la plupart d'entre elles sont exclues sans être retenues. Une recherche de cartouches de porosité plus élevée a donc été entreprise. Les cartouches LMS et PPL contenant 100 mg de phase polymérique et un réservoir de 3 mL n'étaient pas adaptées au volume de l'échantillon car le temps nécessaire pour faire passer un échantillon avec toutefois un vide assez fort pouvait parfois durer près de 45 minutes. D'autre part, même en faisant passer tout l'échantillon, aucune détection du peptide N-terminal de reGH n'a été obtenue. Les cartouches XWP quant à elles, plus adaptées en terme de capacité (500 mg/6 mL) composées d'une phase polymérique n'ont pas non plus permis d'éluer la protéine d'intérêt et d'en identifier le peptide N-terminal de reGH. Les cartouches EWP C18 et Widepore C4 ont permis d'atteindre 25 % de rendement sur plasma. La cartouche ayant permis d'atteindre un rendement supérieur à 50 % fut WC4, avec une porosité de 300 Å et une phase inverse C4. La Figure III-34 présente le chromatogramme d'ions du peptide N-terminal de reGH obtenu lors des premiers essais de la stratégie analytique en utilisant la SPE C4.

L'optimisation de la méthode d'extraction de reGH dans le plasma a donc été réalisée à partir de ces cartouches. Différents conditionnements ont été testés ainsi que différents lavages avant de définir que le conditionnement devait être effectué en 3 étapes : 10 mL de MeOH puis 10 mL d'eau MilliQ et enfin 10 mL de tampon phosphate pH 6 0,1 M, correspondant au milieu dans lequel a été repris le culot de protéines précipitées. Après le dépôt de l'échantillon sur la cartouche, celle-ci est lavée une première fois avec 5 mL d'eau MilliQ 0,1 % TFA puis avec 5 mL d'un mélange 70/30 0,1 % TFA (H₂O/ACN). L'élution est ensuite réalisée avec 7 mL d'un mélange (H₂O/ACN) 20/80 0,1 % TFA puis la fraction collectée est mise à évaporer à 48°C sous flux d'azote. La Figure III-35 présente la détection (piège à ions linéaire) dans le plasma d'un ajout de reGH à 10 et 50 µg.L⁻¹ par l'intermédiaire de son peptide N-terminal obtenu après trypsinolyse. Pour la première fois, la capacité de détection de 10 µg.L⁻¹ dans le plasma au moyen d'une prise d'essai de 2,5 mL est démontrée. Le mode CRM quant à lui, permet une très bonne spécificité de détection du peptide N-terminal de reGH avec un rapport signal sur bruit très conséquent en MS³.

En conclusion :

Cette étape de mise au point de la SPE appliquée à la purification de reGH dans le plasma a permis de définir que les phases polymériques n'étaient pas adaptées aux essais de mise aux points sur les cartouches étudiées. En effet, les essais d'élution sur les cartouches ont été effectués principalement en essayant différents rapport H₂O/ACN 0,1 % TFA et il est probable qu'une recherche plus approfondie sur le choix d'autres solvants d'élution aurait peut-être permis l'obtention d'un résultat plus probant. Cependant, compte-tenu du temps imparti pour le développement de la méthode, il a été décidé d'optimiser les voies permettant déjà d'obtenir un résultat dans des conditions d'élution moyenne pour espérer par la suite les optimiser.

A la suite des essais d'optimisation, les cartouches ayant permis une bonne détection de reGH dans le plasma à 100 µg.L⁻¹ ont été sélectionnées : WC4, 300 Å de porosité. Sur cette cartouche, des essais supplémentaires ont été réalisés avec et sans réactif d'appariement-d'ions (TFA). L'emploi d'un réactif de paire-d'ions permet de jouer sur la rétention des molécules avec la phase lorsque cet agent se lie à ces dernières par des interactions ioniques ce qui modifie l'hydrophobicité des molécules contenues dans l'échantillon. Les résultats les plus convaincants ont toujours été obtenus en présence de 0,1 % de TFA. De telles conditions, ont également été utilisées en HPLC lors de la séparation de l'hormone de croissance recombinante humaine sur colonne de phase inverse C₄ avec un gradient H₂O/ACN 0,1 % TFA (Teshima *et al.*, 1991 ; Oroszlan *et al.*, 1992). L'interaction des protéines issues de la précipitation à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium avec une phase très faiblement greffée « C₄ », est expliquée par l'augmentation de la capacité de liaison par interaction hydrophobe des protéines avec la phase en présence de forte concentration en sel dans l'échantillon. Ces conditions initiales sont à la base de la chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC) dont les premiers postulats ont été émis par Tiselius en 1948 (Tiselius, 1948) puis plus tard par Porath (Porath *et al.*, 1973) et Hjertén (Hjertén *et al.*, 1974). L'utilisation de la SPE en phase inverse avec une porosité de 300 Å a donc été utilisée dans des conditions proches de la HIC. A noter qu'il a été rapporté de l'HIC pour purifier de l'hormone de croissance équine (Cahill *et al.*, 1994) et humaine (de Oliveira *et al.*, 1999) sur une phase sepharose phenylCL4B peu substituée. Il semble que la SPE utilisée dans les conditions opératoires telles que définies à cette étape permette d'ores et déjà d'envisager de détecter la reGH dans le plasma à des concentrations comprises entre 10 et 50 ng.mL⁻¹.

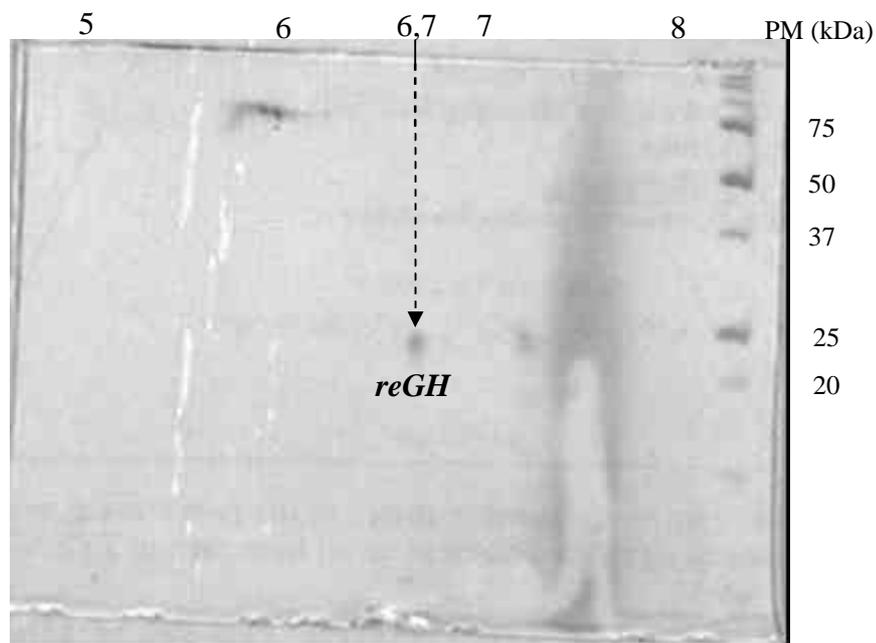


Figure III-36 : électrophorégramme bidimensionnel obtenu après dépôt de 3 µg de reGH sur un IPG-strip de pH 5-8 suivi d'une isoélectrofocalisation, migration SDS page et révélation au Bio-Safe Coomassie blue

Tableau III-11 : types de colorations plus sensibles que le Biosafe coomassie blue, disponibles sur le marché et compatibles avec la spectrométrie de masse

Méthodes	Sensibilités par bande	Temps de coloration
Dodeca silver stain kit	0,25 – 0,5 ng	3 heures
Silver stain plus kit	0,6 – 1,2 ng	1,5 heures
Sypro ruby	1 – 10 ng	3 heures
Sypro orange	4 – 8 ng	45 min

3.3.3. Évaluation de l'approche E2D dans la stratégie analytique

La mise au point des conditions d'électrophorèse bidimensionnelle a été réalisée pour étudier les potentialités d'une approche protéomique afin de purifier directement l'hormone de croissance équine recombinante à partir du plasma après une précipitation au sulfate d'ammonium. En premier lieu, un travail de mise au point a été nécessaire pour obtenir à la fois les meilleures conditions de réhydratations du « strip » contenant le gradient de pH immobilisé et de voltage pour focaliser correctement les protéines. La Figure III-36 présente un électrophorégramme 2D obtenu à partir de 3 µg de standard de reGH. Sur cette figure, l'hormone de croissance équine recombinante est bien définie dans le gel. Elle se situe à un pI de l'ordre de 6,7 – 6,8 et à une masse de 22 kDa. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment observés dans la littérature pour de l'eGH. En effet, il a été montré que le pI de l'eGH était de l'ordre de 6,7 – 6,8 (Conde *et al.*, 1973). A la suite de ces résultats sur standard, des essais ont été réalisés après précipitation de plasma contenant 100 µg.L⁻¹ de reGH à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium. L'E2D n'étant pas compatible avec les fortes concentrations en sel présentes dans l'échantillon à l'issue de la précipitation au sulfate d'ammonium (échauffement et dégradation prématurée du « strip »), la SPE C4 a été utilisée comme moyen de dessalage puis précipitation des protéines éluées avec du TCA 10 % final. Dans ces conditions, des essais sur matrices ont été réalisés et les protéines ont été à chaque fois bien focalisées mais l'hormone de croissance équine recombinante n'a jamais été visible à 50, 100 ni 500 ng.mL⁻¹ car la sensibilité de la coloration a été jugée insuffisante. Cette coloration de mise au point n'a pas permis d'observer de spot de reGH excisable et caractérisable après digestion trypsique « in gel » par spectrométrie de masse. Il est envisageable qu'une coloration plus sensible permette d'observer un spot de reGH à de telles concentrations si à la fois la première dimension et la seconde sont réalisées dans les conditions optimales. Les colorations de gels disponibles dans le commerce et compatibles avec la spectrométrie de masse sont présentées dans le Tableau III-11. Il apparaît dans ce tableau, que les colorations à l'argent sont les plus sensibles car elles permettent théoriquement la détection de 0,5 ng de protéine contenue dans un spot.

En conclusion :

Cette étape de mise au point et d'évaluation de l'E2D dans la stratégie analytique a conduit à définir des conditions opératoires robustes et répétables pour obtenir des gels 2D avec des spots bien résolus à partir de plasmas précipités à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium, suivi d'une extraction par SPE C4 et d'une précipitation au TCA 10 % final des protéines contenues dans la fraction. La mise en place de cette méthode n'a pas permis de révéler le spot de reGH à une concentration de reGH de $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ dans le plasma (PE : 2,5 mL, soit théoriquement 1,25 μg) mais a permis de confirmer le potentiel de dessalage de la SPE. Compte tenu des résultats obtenus avec la coloration Biosafe Coomassie blue, il est possible de pouvoir augmenter la sensibilité de détection avec une coloration à l'argent pour détecter un ajout à $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ de reGH dans le plasma mais cela ne permettrait toutefois pas d'atteindre les objectifs déjà atteints par la SPE C4 seule soit $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Les résultats relevés dans la littérature où l'E2D a été utilisée comme moyen de purification de l'hormone de croissance indiquent qu'il est nécessaire de disposer d'une quantité importante de la molécule d'intérêt. En effet, les E2D pratiquées sur des lyophilisats d'hypophyses humaines ont nécessités près de 580 μg de protéines (Beranova-Giorgianni et Desiderio, 2000 ; Zhan et Desiderio, 2003) et une coloration à l'argent. La mise en évidence de la non-conformité de lots de Genotropin[®] a nécessité quant à elle 500 μg de la protéine standard et une coloration à l'argent (Hepner *et al.*, 2005) et enfin, la détection d'un ajout de rbGH dans le lait a été réalisée à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Pinel *et al.*, 2005) avec une coloration au bleu de Coomassie G250. Les sensibilités envisageables par cette technique ne permettent donc pas de la considérer comme très performante pour caractériser de la reGH présente dans le plasma à l'état de trace et il a donc été décidé de ne pas donner suite à cette étape par la suite dans notre stratégie analytique.

3.3.4. Évaluation de l'approche IAC dans la stratégie analytique

La mise au point des conditions de chromatographie d'immunoaffinité a été réalisée pour permettre de purifier directement l'hormone de croissance équine recombinante à partir du plasma après une précipitation au sulfate d'ammonium.

Pendant le travail de thèse, deux lapins ont reçu régulièrement des administrations de reGH dans l'objectif d'obtenir des anticorps anti-reGH, en utilisant en première injection de l'adjuvant complet de Freund (huile minérale et paroi de mycobactéries) pour stimuler la production d'anticorps et ensuite de l'adjuvant incomplet de Freund (huile minérale) pour l'entretenir.

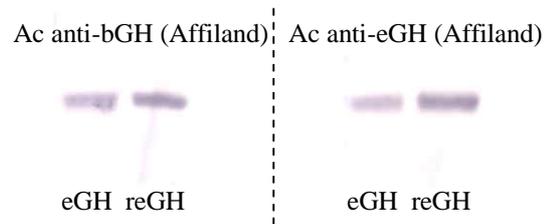


Figure III-37 : Western-Blot réalisés à partir des deux anticorps Affiland anti-bGH et anti-eGH à disposition pour réaliser la chromatographie d'immunoaffinité. 1,5 µg d'hormone par puit.

Après l'obtention du sérum de ces animaux, un protocole de purification des anticorps a été réalisé (acide caprylique et précipitation des anticorps à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium) et a permis d'aboutir pour le premier animal à une quantité de 6,6 mg d'anticorps et pour le second de 8 mg. Ces anticorps ont été testés par Western-Blot à une dilution très faible (1/250) et se sont avérés assez peu performants dans la reconnaissance de reGH. Dans ce contexte, afin de disposer d'anticorps permettant une meilleure reconnaissance de reGH, des anticorps déjà purifiés anti-bGH et anti-eGH ont été achetés auprès d'Affiland (Belgique). Ces anticorps ont été testés dans les mêmes conditions par Western-Blot pour apprécier leurs spécificités vis-à-vis de reGH afin de sélectionner le meilleur candidat pour le travail sur colonne d'immunoaffinité. La Figure III-37 présente les résultats ainsi obtenus. Les deux lots d'anticorps Affiland ont très bien reconnu l'eGH et la reGH.

En conclusion :

L'étude par Western-Blot vis-à-vis de reGH de quatre anticorps différents provenant de deux lapins immunisés et d'Affiland a permis de définir que les anticorps anti-eGH et anti-bGH permettaient de reconnaître convenablement l'eGH et la reGH. Dans ces conditions et pour des raisons de répétabilité des analyses sur le long terme, les premiers essais du développement de la méthode utilisant l'immunoaffinité comme moyen de purification spécifique de reGH dans le plasma ont été conduits à partir de colonnes pré-greffées contenant les anticorps anti-bGH (Affiland) et anti-eGH (Affiland).

Le comportement des anticorps anti-bGH et anti-eGH que nous avons à notre disposition a été étudié par SPR en les greffant chacun sur un canal de la puce afin d'observer leurs mécanismes d'interaction vis-à-vis de la reGH *via* leur sensorgramme. L'impact des conditions de régénération de la puce correspondant aux conditions potentiellement utilisables par la suite en IAC a été évalué. Différentes conditions de pH ont été utilisées (pH 2,5 ; 5 ; 7 ; 10) à des concentrations en sel variées pour permettre d'éluer les molécules d'hormone de croissance recombinante. Grâce aux informations obtenues par la SPR, il est apparu qu'une élution basique en présence de sel avec un peu de solvant organique pouvait permettre de séparer les complexes Ag-Ac lorsque les anticorps anti-bGH Affiland étaient utilisés. Les essais de mise au point à partir des anticorps anti-eGH Affiland n'ont pas permis de les envisager comme anticorps utilisable pour l'IAC car il n'a pas été possible d'établir les conditions d'élution de toute la reGH fixée (pas de retour à la ligne de base du sensorgramme).

Signal de reGH
933,3 > 933,3

Signal de l'étalon externe
869,3 > 869,3

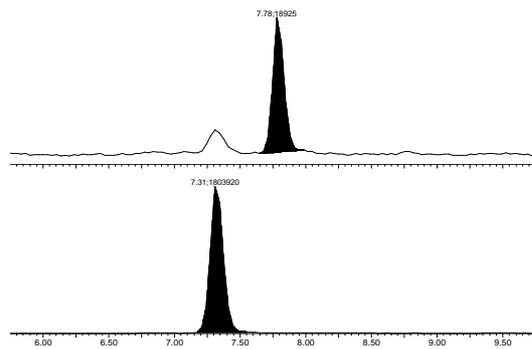


Figure III-38 : chromatogramme d'ions représentant la détection du peptide N-terminal résultant de la digestion enzymatique de 6 µg de reGH éluées après une colonne prégreffée par Affiland avec anticorps anti-bGH. Elution avec 250 mM NaCl, 25mM NaOH, 10% ACN

Signal de l'étalon externe
869,3 > 869,3

Signal standard N-terminal reGH
933,3 > 933,3

Signal de l'étalon externe
933,3 > 933,3

Détection de 100 ng.mL⁻¹
dans le plasma
933,3 > 933,3

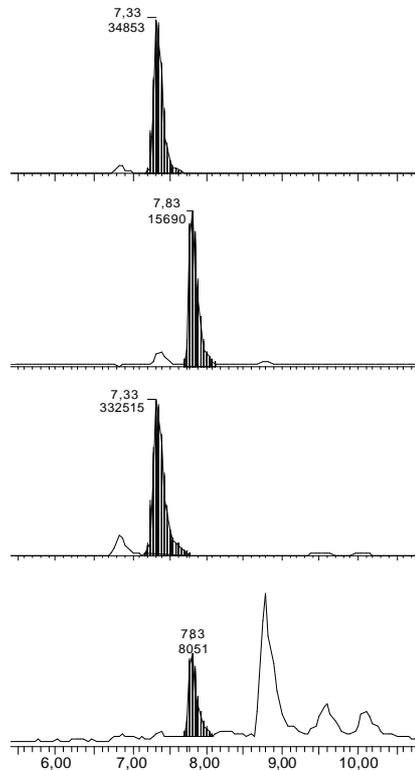


Figure III-39 : chromatogramme d'ions du peptide N-terminal de reGH dans un ajout de 100 ng.mL⁻¹ de reGH dans le plasma. Purification de la reGH par immunoaffinité avec des anticorps anti-bGH Affiland gréffés sur une colonne Amersham NHS-activée. Elution par 70/30 éthanol eau en tampon acétate 0,2 M pH 5,6

Il semble que ces anticorps ont présenté une si grande affinité pour reGH qu'il n'a pas été possible de dissocier le complexe Ag-Ac sans détruire l'intégrité du canal greffé par l'anticorps anti-eGH.

Avec les informations obtenues par la SPR, une colonne prégreffée avec des anticorps anti-bGH a été testée avec la molécule de reGH dans du tampon glycine 50 mM pH 8. Les premiers essais d'élution (conditions basiques) effectués avec 6 µg de reGH ont permis de mettre en évidence la molécule d'hormone de croissance équine recombinante caractérisée par son peptide N-terminal. Par la suite, l'optimisation des conditions d'élution avec 250 mM NaCl, 25 mM NaOH et 10 % ACN a permis d'obtenir une meilleure détection du peptide N-terminal en travaillant toujours à l'aide du standard d'hormone reGH (Figure III-38). Cependant, l'utilisation de sel, favorable à l'élution de l'IAC n'est pas complètement compatible avec la spectrométrie de masse en raison du phénomène de suppression ionique. Différentes techniques de dessalage ont alors été utilisées, Vivaspin 5 kDa, PD10 ou SPE C4 mais aucune n'a permis d'améliorer la sensibilité de détection de reGH en travaillant avec la molécule entière dans le tampon comme préconisé par Affiland.

L'utilisation de 250 mM de NaCl pouvant produire des phénomènes de suppression d'ions lors de l'identification du peptide N-terminal de reGH par spectrométrie de masse, une autre voie de recherche a donc été explorée pour pouvoir éluer la molécule de reGH sans utiliser les 250 mM de NaCl. La colonne pré-greffée étant trop usagée pour continuer la mise au point de la méthode, il a été décidé de greffer sur une colonne NHS-activée les anticorps anti-bGH Affiland utilisés précédemment pour continuer l'étude de l'interaction Ag-reGH. De multiples essais ont permis de définir qu'une élution avec 70/30 éthanol/H₂O en tampon acétate 0,2 M pH 5,6 permettait de réaliser le meilleur compromis entre l'élution de la molécule lors de l'IAC et la spectrométrie de masse. Ces conditions opératoires ont permis de détecter un ajout de reGH à 100 ng.mL⁻¹ dans le plasma de cheval (Figure III-39).

En conclusion :

Le développement d'un protocole d'immunoaffinité pour détecter de la reGH dans le plasma a permis de mettre en évidence un ajout à la concentration de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$. Durant le développement de la méthode, plusieurs points cruciaux sont apparus comme notamment le choix des anticorps, la mise au point des conditions d'élution de la molécule et la compatibilité des conditions mises au point avec la spectrométrie de masse. Les informations collectées concernant l'utilisation de l'IAC comme moyen de détection d'hormone de croissance dans le plasma indiquent une détection d'un ajout de rpGH à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ dans du sérum bovin au moyen d'anticorps polyclonaux en utilisant un mélange 70/30 éthanol/H₂O comme éluant (Blokland *et al.*, 2003). Les résultats obtenus avec les conditions d'élution compatibles avec la spectrométrie de masse sont proches (70/30 éthanol/H₂O en tampon acétate 0,2 M pH 5,6) et permettent d'envisager une détection inférieure à $100 \mu\text{g.L}^{-1}$. L'investissement temporel et financier pour le développement de l'immunoaffinité dans la stratégie analytique de détection de reGH à l'état de trace dans le plasma a été important au regard de la limite de détection atteinte. Les résultats de détection directe de reGH dans le plasma à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ au moyen de la SPE C4 ont été jugés plus prometteurs ; dans ces conditions, le développement de l'IAC dans la stratégie analytique a été arrêté au profit de l'optimisation de conditions opératoires liées à la détection directe de reGH dans le plasma par SPE.

3.3.5. Optimisation des conditions d'hydrolyse enzymatique

Comme exposé précédemment lors de la caractérisation des standards d'hormone de croissance par spectrométrie de masse et généralement admis, les protéines entières (haut poids moléculaire) directement analysées après ESI produisent une « enveloppe protéique » correspondant aux différents états de charge de la molécule. Le fait est que toutes ces charges divisent le signal de détection de la molécule ce qui est très préjudiciable à la détection de molécules protéiques à l'état de trace dans une matrice biologique complexe contrairement à l'analyse de leurs peptides étudiés séparément. Il a donc été réalisé une étude *in silico* pour définir une enzyme adaptée à l'hydrolyse enzymatique des GH. Ensuite, le comportement de cette enzyme a été étudié sur standard et sur matrice.

Tableau III-12 : Productions de peptides *in silico* à partir de l'hormone de croissance équine recombinante (reGH)

Nom de l'enzyme ou du réactif	Nombre de coupures	Positions des sites de coupure
Arg-C proteinase	14	17 34 42 70 77 95 108 114 125 133 150 177 182 183
Asp-N endopeptidase	11	26 64 71 106 114 128 142 145 151 152 167
LysC	10	30 64 112 139 144 157 166 167 171 180
Pepsin (pH1,3)	73	2 6 9 10 10 11 15 16 20 21 23 28 29 31 35 43 51 52 53 54 74 75 75 76 78 80 80 81 81 82 85 86 86 91 92 92 93 96 100 101 102 103 109 112 113 115 122 123 126 137 138 142 144 145 148 149 154 155 155 156 158 160 161 161 162 164 165 174 175 175 176 190 191
Proteinase K	84	2 4 7 10 11 12 14 15 16 18 21 24 25 26 28 29 32 35 36 37 43 45 48 50 51 52 54 57 58 60 62 67 75 76 78 80 81 82 83 86 87 90 92 93 96 97 98 101 102 103 105 109 110 113 116 120 122 123 127 134 137 138 141 142 145 147 149 154 155 156 159 161 162 165 169 172 174 175 176 178 184 185 190 191
Trypsin	24	17 30 34 42 64 70 77 95 108 112 114 125 133 139 144 150 157 166 167 171 177 180 182 183

Tableau III-13 : caractéristiques des peptides N-terminaux théoriquement produits par trypsinolyse des hormones de croissance eGH, reGH, pGH, rpGH, bGH et rbGH :

Types d'hormones de croissance	Séquence N-terminale	Position	Masse (Da)
Équine	FPAMPLSSLFANAVLR	1-16	1733
Recombinante équine	MFPAMPLSSLFANAVLR	1-17	1864
Porcine	FPAMPLSSLFANAVLR	1-16	1733
Recombinante porcine	AFPAMPLSSLFANAVLR	1-17	1804
Bovine	AFPAMSLSGLFANAVLR	1-17	1764
Recombinante bovine	MFPAMSLSGLFANAVLR	1-17	1824

3.3.5.1. Choix de l'enzyme

La fonction *peptidecutter*[®] du site internet expasy (<http://www.expasy.org/cgi-bin/peptidecutter/peptidecutter.pl>) a permis de réaliser des coupures *in silico* de protéines par un nombre important d'enzymes protéolytiques.

Le Tableau III-12 présente les résultats obtenus lors de l'hydrolyse de l'hormone de croissance équine recombinante par 6 enzymes classiquement utilisées pour générer des peptides. Il est observé que certaines permettent de produire un peptide N-terminal de grande taille (30 acides aminés) comme LysC ou de taille moyenne et intéressante (10 à 25 acides aminés) : Asp-N endopeptidase, Arg-C protéase, trypsine et d'autres de taille trop petite pour être détectées de manière sensible et spécifique par spectrométrie de masse (2 acides aminés) : pepsine et protéase K.

Pour l'identification de reGH dans le plasma par une méthode directe, la trypsine, protéase la plus étudiée et utilisée en protéomique a été préférentiellement choisie pour sa capacité à générer un peptide N-terminal de taille convenable (17 acides aminés) pour l'étude en LC-MS/MS. Les digestions tryptiques *in silico* des hormones de croissance eGH, reGH, pGH, rpGH, bGH et rbGH ont permis de définir les différentes caractéristiques de chacun des peptides N-terminaux (Tableau III-12). Ces peptides sont très proches en séquence, ils ne diffèrent que par quelques acides aminés et dans le cas des hormones eGH et pGH sont identiques.

3.3.5.2. Sur standard

Une cinétique de production du peptide N-terminal de reGH a été réalisée sur 24 heures par spectrométrie de masse avec mesure régulière de la production du peptide N-terminal reGH. L'étude a été réalisée avec un rapport classique enzyme:substrat de 1:20 en tampon EPAB (EDTA-Pepstatine A-Ammonium Bicarbonate) pH 7,9 contenant 10 mM d'EDTA, 1 µM de Pepstatine A et 50 mM de bicarbonate d'ammonium. L'EDTA est utilisé comme chélateur de métaux divalents c'est-à-dire permettant de déplacer le métal des métalloprotéases (inhibiteur) et afin d'éviter la formation d'oligomères de GH dans les vials lors du stockage des standards à 4°C. La pepstatine A est un inhibiteur des aspartyles protéases.

La cinétique obtenue est présentée Figure III-40. Il est observé que la durée comprise entre 800 min (13h) et 1200 min (20h) est optimale pour une hydrolyse de l'hormone de croissance équine recombinante par la trypsine à température ambiante. Lors de l'analyse des échantillons pendant la nuit, l'arrêt de l'agitation s'est traduit par une baisse du rendement d'hydrolyse enzymatique.

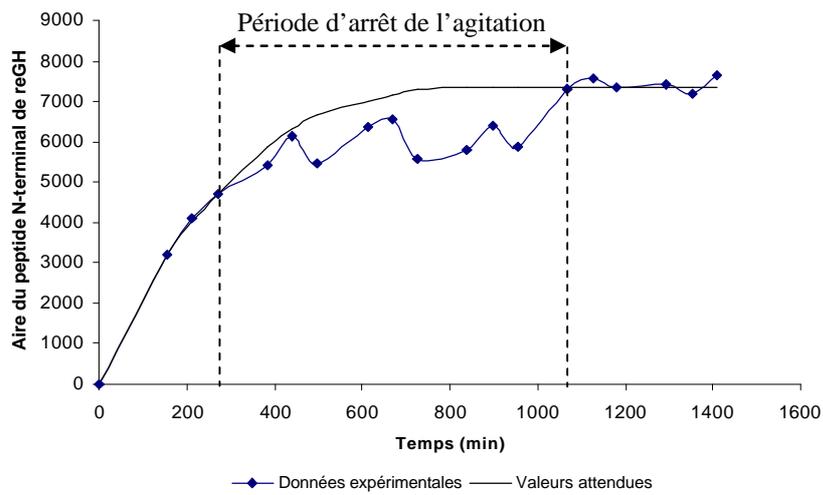


Figure III-40 : production du peptide N-terminal reGH pendant 24h à température ambiante. L'arrêt de l'agitation pendant la période nocturne a eu un impact sur le rendement d'hydrolyse enzymatique

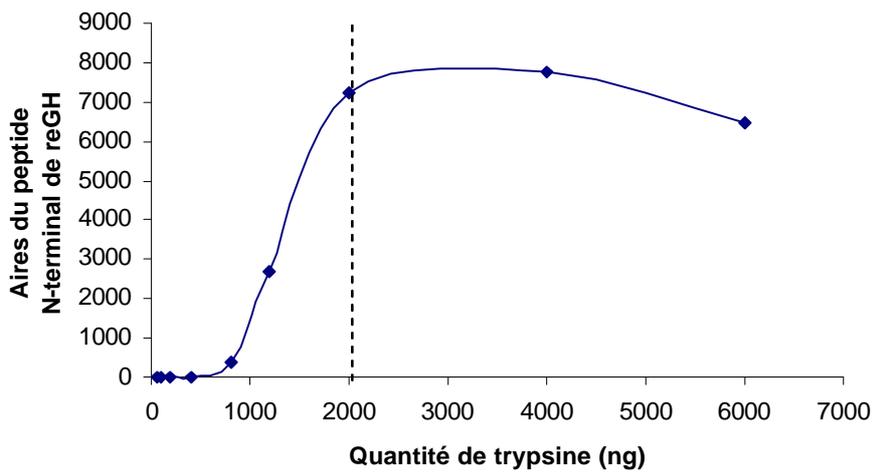


Figure III-41 : optimisation de la quantité de trypsine «sequence grade » à ajouter à l'échantillon de plasma $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ extrait pour obtenir la détection du peptide N-terminal de reGH la plus importante. Les échantillons identiques ont été extraits en même temps, seule la quantité de trypsine ajoutée est différente.

La courbe montre qu'il est donc important de réaliser des agitations régulières pendant l'hydrolyse enzymatique pour obtenir le maximum de rendement.

3.3.5.3. Sur matrice

Une optimisation de la quantité d'enzyme à ajouter à l'échantillon extrait après précipitation au sulfate d'ammonium à 45 % de saturation et une extraction en phase solide (SPE C4) pour maximiser la détection du peptide N-terminal a été réalisée. Pour des mêmes extraits de plasma contenant de la reGH en quantité équivalente (200 µg), une quantité croissante de trypsine « sequence grade » a été testée (de 10 ng à 6 µg). La Figure III-41 montre la courbe de l'évolution de la quantité de peptide N-terminal de reGH détectée en fonction des différentes quantités de trypsine ajoutées. L'incubation a été réalisée pendant 15 heures à 37°C en tampon EPAB pH 7,9. Sur ces échantillons extraits, le maximum de détection du peptide N-terminal est atteint à partir de 2 µg de trypsine mélangés à l'échantillon et se stabilise à 4 µg pour diminuer de nouveau, sûrement par un trop grand excès d'enzyme. Pour ne pas avoir une quantité de trypsine néfaste à la détection de reGH présente à l'état de trace dans le plasma, il a été décidé de se placer à 2 µg pour 200 µg de reGH dans le plasma, c'est-à-dire au début du plateau.

En conclusion :

Deux microgrammes de trypsine sont ajoutés à une prise d'essai de 4 mL de plasma dont la quantité de reGH a été fixée à 200 µg. Le rapport E:S établi uniquement en considérant l'hydrolyse de la trypsine appliquée à la reGH est donc de 1:100. Ce rapport E:S est surestimé compte tenu de la présence probable d'autres protéines contenues dans l'échantillon lors de la trypsinolyse. Par conséquent, il est probable que les 2 µg de trypsine aient été ajoutés au maximum à 2 mg de protéines totales soit un rapport E:S maximum de 1:10 ce qui peut représenter un ordre de grandeur moyen de l'ordre de E:S à 1:50. L'étude de la littérature a permis de définir que les rapports E:S utilisés pour hydrolyser des hormones de croissance par de la trypsine étaient compris entre 1:10 (Giorgianni *et al.*, 2004) et 1:100 (Johnson *et al.*, 1989 ; Canova-Davis *et al.*, 1996) avec une plus forte abondance de résultats compris entre 1:25 (Becker et Hsiung, 1986 ; Teshima *et al.*, 1991 ; Kim et Brooks, 1993 ; Chang *et al.*, 1997 ; Laidler *et al.*, 1998 ; Secchi *et al.*, 2001) et 1:50 (Graf et Li, 1974 ; Zakin *et al.*, 1976 ; Frenz *et al.*, 1990 ; Heutmekers *et al.*, 2007). Par conséquent, les résultats obtenus semblent être en accord avec les données de la littérature.

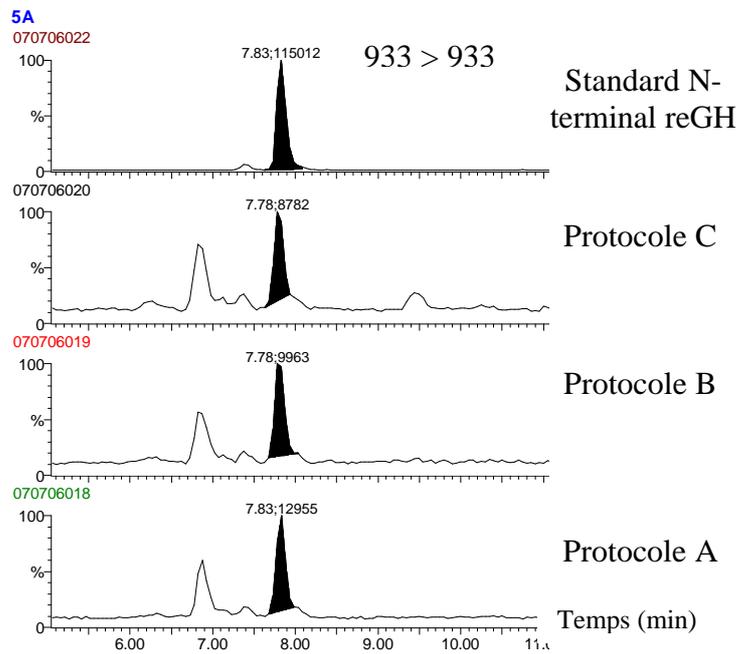


Figure III-42 : chromatogramme d'ions correspondant au suivi du peptide N-terminal reGH par LC-ESI-(+)-MS après digestion « in-gel » (933,3 > 933,3).

3.3.5.4. « in-gel »

Simultanément à l'E2D, il a été mis en place un protocole de digestion des protéines « in-gel ». Les spots ont été découpés à l'aide d'un emporte-pièce puis recoupés pour former de petites particules de gel facilitant l'élimination du SDS et du colorant pendant les étapes de lavage mais aussi et surtout permettant un accès plus facile à la trypsine.

Trois protocoles (A, B, C) différents ont été évalués. Le protocole A donnant les meilleurs résultats est celui détaillé dans la partie matériel et méthodes. Brièvement, les paramètres testés entre les 3 protocoles étaient liés au temps de décoloration des spots et aux modalités d'extraction des peptides après trypsinolyse des peptides « in-gel ». La Figure III-42 présente le suivi du peptide N-terminal caractéristique de l'hormone de croissance équine recombinante après application des 3 protocoles à des bandes de gel estimées identiques (1 µg) en travaillant avec le standard uniquement. La digestion « in-gel », après décoloration du Bio-Safe Coomassie a montré qu'il était envisageable de pouvoir caractériser par spectrométrie de masse un spot de reGH à condition de pouvoir le détecter sur le gel.

En conclusion :

Un protocole de digestion « in gel » de reGH a été mis au point. Comme la stratégie E2D n'a pas été retenue, les conditions de trypsinolyse n'ont pas été davantage optimisées. Il est possible que la quantité de trypsine ajoutée pour réhydrater les particules de gel (20 ng.µL⁻¹) n'ait pas été assez importante pour détecter la molécule de reGH lors des essais sur matrice. En effet, il a été rapporté lors des applications de l'E2D aux hormones de croissance des concentrations de trypsine variables, comprises entre quelques dizaines de ng.µL⁻¹ (Grigorian *et al.*, 2005 ; Zhan *et al.*, 2005) et plusieurs centaines de ng.µL⁻¹ (Beranova-Giorgianni et Desiderio, 2000 ; Pinel *et al.*, 2005).

3.3.5.5. Après électroélution des protéines contenues dans le gel d'acrylamide

Pour éviter de colorer les gels et de révéler les protéines, une stratégie d'électroélution de protéines contenues dans un gel d'acrylamide a été entreprise en se servant de marqueurs de poids moléculaire déjà colorés pour définir les zones à découper dans lesquels la reGH était suspectée d'avoir migrée. Le travail de thèse a permis de développer entièrement le protocole d'électroélution et électrodialyse de protéines.

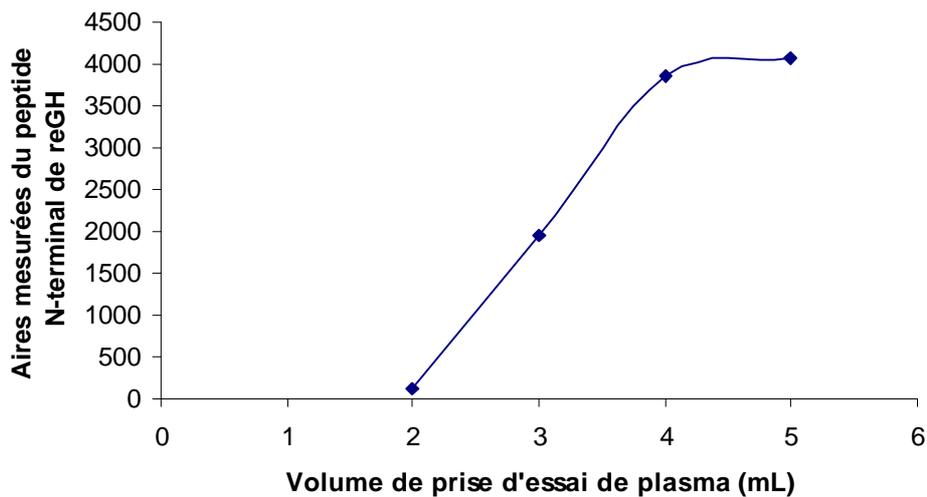


Figure III-43 : optimisation du volume de prise d'essai de plasma pour obtenir la détection la plus importante du peptide N-terminal de reGH

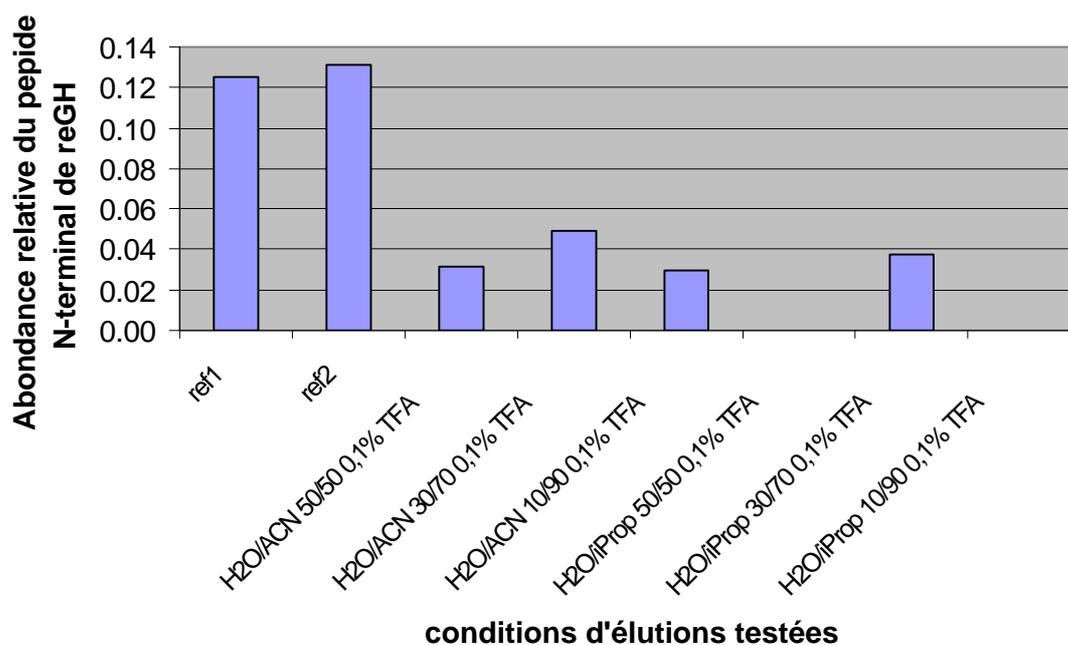


Figure III-44 : abondances relatives du peptide N-terminal de reGH obtenues après purification (sulfate d'ammonium, SPE, trypsinolyse) de 8 plasmas identiques à $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ en utilisant différentes conditions de concentrations des peptides tryptiques avant leur détection en LC-MS/MS. Ref1 et ref2 sont 2 échantillons évaporés sous flux d'azote à 48°C et les autres présentent différentes conditions de mélange H₂O/ACN ou H₂O/iProp utilisées pour éluer les échantillons en microspin C18.

Après séparation des protéines par E1D, la zone d'intérêt comprise entre les marqueurs de poids moléculaire colorés a été découpée puis placée dans la cellule d'électroélution pour faire sortir au moyen d'un courant électrique toutes les protéines contenues dans le morceau de gel. Ensuite, l'électrodialyse du SDS a été réalisée pour permettre la digestion enzymatique en solution des protéines récoltées. Cette stratégie a fonctionné sur standard et n'a malheureusement pas abouti sur matrice.

3.3.6. Optimisation du volume de prise d'essai

Pour obtenir la détection la plus importante du peptide N-terminal de reGH, le protocole de précipitation des protéines à 45 % de saturation en sulfate d'ammonium a été modifié pour pouvoir tester différents volumes de prise d'essai de plasma (2, 3, 4 et 5 mL). Les résultats obtenus sont présentés Figure III-43. Une augmentation constante du signal est observée de 2 mL à 4 mL de plasma. Les signaux obtenus à 4 et 5 mL de plasma étant identiques, il a été décidé de travailler avec une prise d'essai de 4 mL de plasma pour aboutir au maximum de sensibilité.

3.3.7. Optimisation des conditions de concentration des peptides avant leur analyse par LC-MS/MS

Au cours du développement de la méthode de détection directe de reGH dans le plasma, différentes conditions de concentrations des peptides ont été testées pour tenter d'optimiser les résultats obtenus par simple évaporation sous flux d'azote à 48°C des produits de digestion enzymatique. La Figure III-44 présente les résultats de mise au point. 8 plasmas contenant chacun un ajout d'hormone de croissance équine recombinante à 50 ng.mL⁻¹ ont été réalisés puis purifiés dans les mêmes conditions. Les références 1 et 2 sont ceux qui ont été évaporés sous flux d'azote à 48°C en fin de protocole. Les résultats homogènes obtenus après LC-MS/MS pour les deux références ont permis de vérifier une assez bonne répétabilité de la mesure. Les essais de concentration et de dessalage des peptides sur microspin C₁₈ des six autres plasmas purifiés ont conduit à tester différentes conditions d'éluion du peptide N-terminal de reGH sur cette phase. Les résultats obtenus sur échantillons de plasma montrent que la détection du peptide N-terminal n'est pas améliorée par l'utilisation d'un système de concentration et de dessalage des peptides, elle est au contraire diminuée. Les informations collectées indiquent que la concentration des échantillons par évaporation sous flux d'azote à 48°C permet une détection trois fois plus importante du peptide N-terminal caractéristique de reGH dans le plasma que par concentration sur membrane microspin C₁₈. Dans ces conditions, la technique d'évaporation des peptides tryptiques avant analyse par LC-MS/MS a donc été conservée.

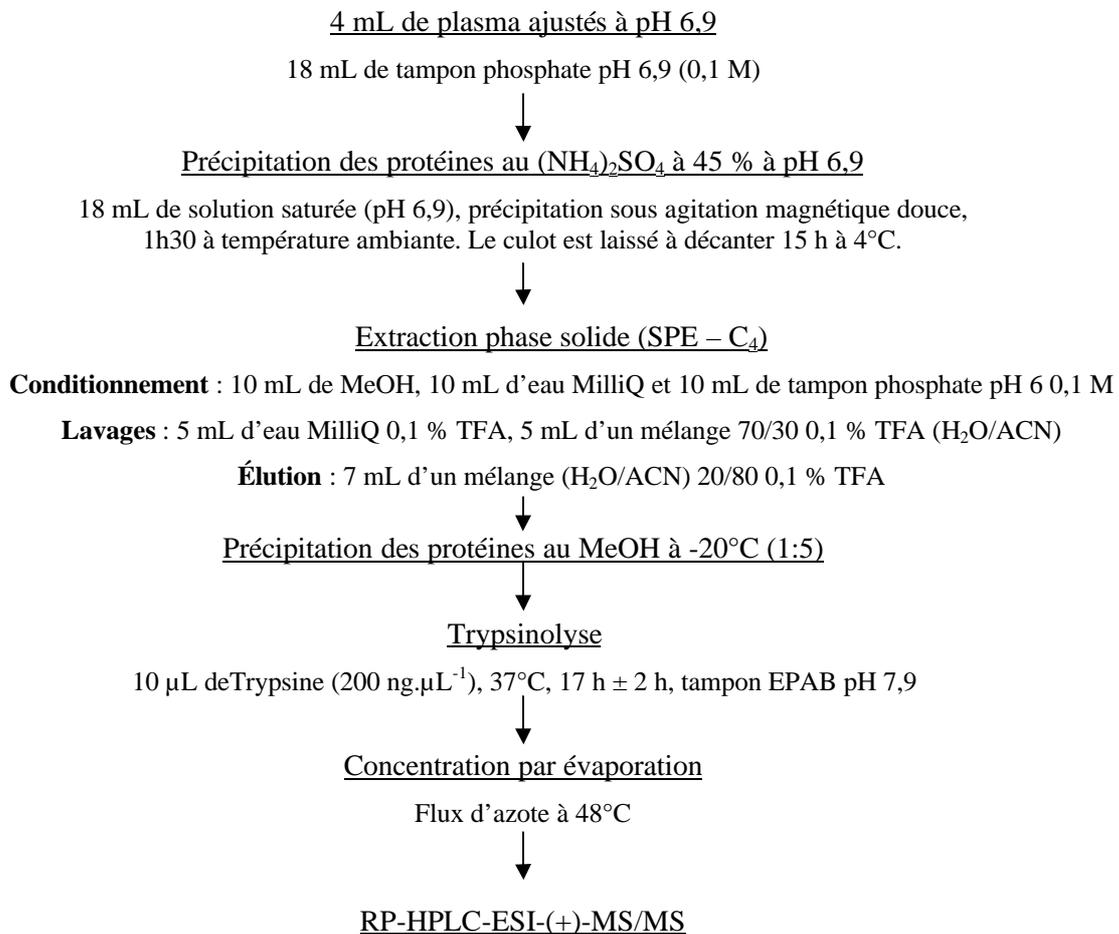


Figure III-45 : schéma du principe de la détection directe de reGH dans le plasma par détection de son peptide N-terminal caractéristique.

3.3.8. Protocole final

Une stratégie analytique de détection directe de reGH dans le plasma par détection de son peptide N-terminal spécifique a été élaborée. La mise au point de la méthode s'est articulée autour d'un squelette commun faisant appel à 3 techniques très différentes : l'extraction sur phase solide (SPE), l'immunoaffinité (IAC) et l'électrophorèse bidimensionnelle (E2D). En ce qui concerne les protocoles faisant appel à la SPE ou l'IAC, la détection d'ajout de reGH dans le plasma à $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ a été rendue possible. Les résultats en E2D n'ont pas permis d'identifier d'ajouts de reGH dans le plasma.

La Figure III-45 récapitule le protocole final. 4 mL de plasma sont ajustés à pH 6,9 avec 18 mL de tampon phosphate 0,1 M pH 6,9. A température ambiante, 18 mL d'une solution saturée de sulfate d'ammonium pH 6,9-7,0 sont ajoutés puis la solution protéique est mélangée sous agitation magnétique modérée pendant 1h30. Les protéines précipitées sont ensuite décantées pendant 15 h à 4°C . Pour obtenir le culot de protéines contenant la reGH, une centrifugation est réalisée pendant 20 min à 4000 rpm, le surnageant peut être éliminé par retournement du tube et le culot est repris par 4 mL de tampon phosphate 0,1 M pH 6. Les échantillons sont stockés à 4°C pendant le conditionnement des cartouches SPE. Les tubes collecteurs de fractions en verre sont lavés à l'eau puis à l'acétone avant d'être séchés à 60°C .

Après les étapes de conditionnement et de lavage des cartouches, l'élution des molécules est réalisée par 7 mL d'un mélange ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) 20/80 0,1 % TFA et la fraction ainsi collectée est homogénéisée au vortex puis mise à évaporer à 48°C pendant 45 min. A l'issue de cette étape, 1 mL d'échantillon doit rester présent dans le tube et doit être complété par 5 mL de MeOH à 20°C . La précipitation est réalisée pendant 1h30 au congélateur. Le culot protéique (non visible) est obtenu par centrifugation des tubes pendant 15 min à 4000 rpm à 4°C . 5 mL sont alors éliminés et le 1 mL restant est évaporé à 48°C sous flux d'azote pendant au moins 25 min. Le tube « bien sec » est repris par 120 μL d'EPAB et 20 μL d'ACN. Le mélange est ensuite déposé avec précaution dans l'insert d'un vial HPLC où 10 μL de trypsine séquence grade à $200 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ sont ajoutés et mélangés. La réaction de trypsinolyse est effectuée à 37°C pendant $17 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. Au terme de l'hydrolyse trypsique, l'insert HPLC contenant les peptides est évaporé à 48°C pendant 1h30 sous un léger flux d'azote en utilisant des pipettes Pasteur comme embouts à usage unique. Les peptides sont ensuite repris avec un mélange 70/30 $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 0,2 % AF avant l'analyse de l'échantillon par RP-HPLC-ESI-(+)-MS/MS. La limite de détection dans le plasma a été abaissée à $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ (1 ppb) après la réalisation de toutes les optimisations en axant la recherche et le développement de la méthode sur la SPE C₄.

3.4. Validation de la méthode

Afin de pouvoir estimer la répétabilité et la robustesse de la méthode développée pour identifier la présence de reGH dans le plasma de cheval, une validation de la méthode a été entreprise. Cette validation a été conduite conformément aux critères imposés par la décision 2002/657/EC (JOCE, 2002) et les critères de l'AORC. Lors d'une analyse de confirmation, un minimum de 4 points d'identification doit être atteint par une analyse LC-MS/MS (1 point par ion précurseur et 1,5 point par transition).

3.4.1. Quelques définitions

3.4.1.1. La spécificité

La spécificité est la capacité de la méthode à distinguer l'analyte d'autres composés interférents. La spécificité est estimée par observation des chromatogrammes d'ions des échantillons blancs et vérification de l'absence de coélutions perturbant l'interprétation au temps de rétention des analytes.

3.4.1.2. La linéarité

La linéarité est la capacité de la méthode à fournir une réponse proportionnelle à la concentration en analyte sur un domaine donné. La linéarité est estimée par le calcul du coefficient de détermination R^2 de la droite de régression (intensité relative vs concentration), réalisée à partir d'un mélange d'échantillons blancs différents ($n = 20$), supplémenté à au moins six niveaux de concentration. L'objectif fixé en interne est $R^2 > 0,98$.

3.4.1.3. Limite de décision ($CC\alpha$) et capacité de détection ($CC\beta$)

La limite de décision ($CC\alpha$) est « la limite à partir de laquelle un échantillon peut être déclaré non conforme avec un risque d'erreur égale à α ». Pratiquement, $CC\alpha$ peut être comparée à la limite de détection (LOD) pour les composés interdits et à la limite maximale de résidus (LMR) élargie de l'incertitude de mesure pour les substances autorisées.

La capacité de détection ($CC\beta$) est « la limite à partir de laquelle l'analyte peut être détecté, identifié ou quantifié avec un risque d'erreur égal à β ». En pratique, $CC\beta$ est utilisée pour vérifier que les performances de la méthode sont conformes aux limites imposées par les autorités compétentes, ceci pour les composés interdits.

3.4.2. *Échantillons analysés*

20 échantillons de plasma blancs correspondant à des animaux certifiés non traités avec la reGH ont été utilisés au cours de cette validation (18 femelles et 2 entiers) provenant pour les femelles du centre expérimental de Chambéret et pour les entiers du centre expérimental de Coye la Forêt. Les ajouts de reGH ont été effectués à 5 ng.mL^{-1} dans chacun des plasmas en accord avec l'évaluation effectuée lors du développement de la méthode où la limite de détection avait été fixée à 1 ng.mL^{-1} . En raison des importants volumes de prise d'essai nécessaires pour pouvoir appliquer la méthode (4 mL), la gamme d'étalonnage a été réalisée sur des plasmas blancs différents provenant du Laboratoire des Courses Hippiques et testés sans reGH par spectrométrie de masse. Les points de gamme ont été fixés à 1, 10, 20, 30, 40 ng.mL^{-1} .

3.4.3. *Signaux mesurés et choix de l'étalon interne*

Pour la validation de la méthode, l'hormone de croissance équine recombinante a été mise en évidence par la détection de son peptide N-terminal caractéristique dichargé $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (majoritaire) de masse m/z 933,5 avec comme transition la plus abondante $933,5 > 1287,5$ (signal 1 : S1) et la transition $933,5 > 794,5$ (signal 2 : S2) soit quatre points d'identification. Un étalon interne a été utilisé au cours de cette validation : l'hormone de croissance recombinante bovine (rbGH) ajoutée à 100 ng.mL^{-1} et détectée par son peptide N-terminal ($m/z = 913$).

3.4.4. *Échantillons blancs*

L'analyse des vingt échantillons de plasma blancs, traités le même jour dans les mêmes conditions opératoires, a permis de définir les coefficients de variation de l'amplitude du bruit de fond. Pour S1, signal le plus abondant, il est de 32,6 % et de 37,3 % pour S2. La spécificité a été jugée satisfaisante par vérification de l'absence d'interférences au temps de rétention de la rbGH et de la reGH.

3.4.5. *Droite d'étalonnage*

L'analyse des différents points de la gamme a fourni les paramètres de régression (coefficient de détermination (R^2)), pente (a) et ordonnée à l'origine (b)) des courbes d'étalonnage obtenues pour chacun des deux signaux diagnostiques (S1 et S2). Pour le signal 1 : $R^2 = 0,9983$, $a = 0,0109$, $b = 0,0024$ et pour le signal 2 : $R^2 = 0,9912$, $a = 0,0077$, $b = 0,0010$. Les coefficients de détermination observés sont supérieurs à 0,99. La linéarité de la méthode a donc été jugée convenable.

Tableau III-14 : tableau de synthèse des paramètres de la validation obtenus (n = 20)

Linéarité (R ²)		Répétabilité		Justesse		Dépistage (ng.mL ⁻¹)		Confirmation (ng.mL ⁻¹)	
S1 relatif	S2 relatif	CV TR relatif	CV amplitude de S1 relatif	CV amplitude S2 relatif	5 µg.L ⁻¹	CC α	CC β	CC α	CC β
0,9983	0,9912	0,4 %	23 %	16,1 %	30 % (3 µg.L ⁻¹)	0,2	0,4	0,3	0,7

3.4.6. *Échantillons supplémentés*

Pour les vingt plasmas supplémentés à $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ par reGH, les coefficients de variation pour le temps de rétention des deux transitions suivies, les amplitudes des signaux et les rapports d'amplitude entre les deux signaux S1 et S2 ont été calculés. Le coefficient de variation obtenu pour les temps de rétention est de 0,4 %, la limite étant fixée à 2,5 % en chromatographie liquide, cela a été jugé très satisfaisant. Le coefficient de variation observé entre les vingt analyses pour le rapport d'intensité du signal 1 est de 23 % et de 16,1 % pour le second. Le rapport d'intensité S1 est légèrement supérieur à la limite inférieure acceptable de 20 %. La variabilité du ratio S1 sur S2 est très satisfaisante car calculée à 17,4 % (coefficients de variation compris entre 10 et 50 %).

3.4.7. *Limites critiques obtenues*

La limite de décision ($CC\alpha$) obtenue en dépistage (signal 1) a été calculée à $0,2 \text{ ng.mL}^{-1}$ et en confirmation (signal 2) à $0,3 \text{ ng.mL}^{-1}$. La capacité de détection ($CC\beta$) obtenue en dépistage est de $0,4 \text{ ng.mL}^{-1}$ et de $0,7 \text{ ng.mL}^{-1}$ en confirmation. Le Tableau III-14 présente les caractéristiques de la validation.

Les valeurs statistiques ainsi obtenues semblent assez optimistes au regard des résultats préliminaires obtenus au cours du développement de la méthode. Cependant, il a été néanmoins détecté à la limite de $s/n = 3$ un ajout de reGH à $0,8 \text{ ng.mL}^{-1}$ dans le plasma mais aucun ajout de l'ordre de $0,4 \text{ ng.mL}^{-1}$ n'a jamais pu être détecté en pratique (avec $s/n = 3$). Il est important de rappeler que la gamme d'étalonnage a été réalisée à partir de plasmas blancs du LCH testés par spectrométrie masse sans reGH dont la qualité en terme de stockage, d'aspect (hématies) a été estimée inférieure à ceux provenant des centres expérimentaux. Dans ces conditions, l'écart avec la décision 2002/657/CE où la gamme d'étalonnage doit être réalisée avec le plasma mis à disposition pour faire la validation des blancs et des ajouts peut avoir induit des valeurs de $CC\alpha$ et de $CC\beta$ légèrement surestimées.

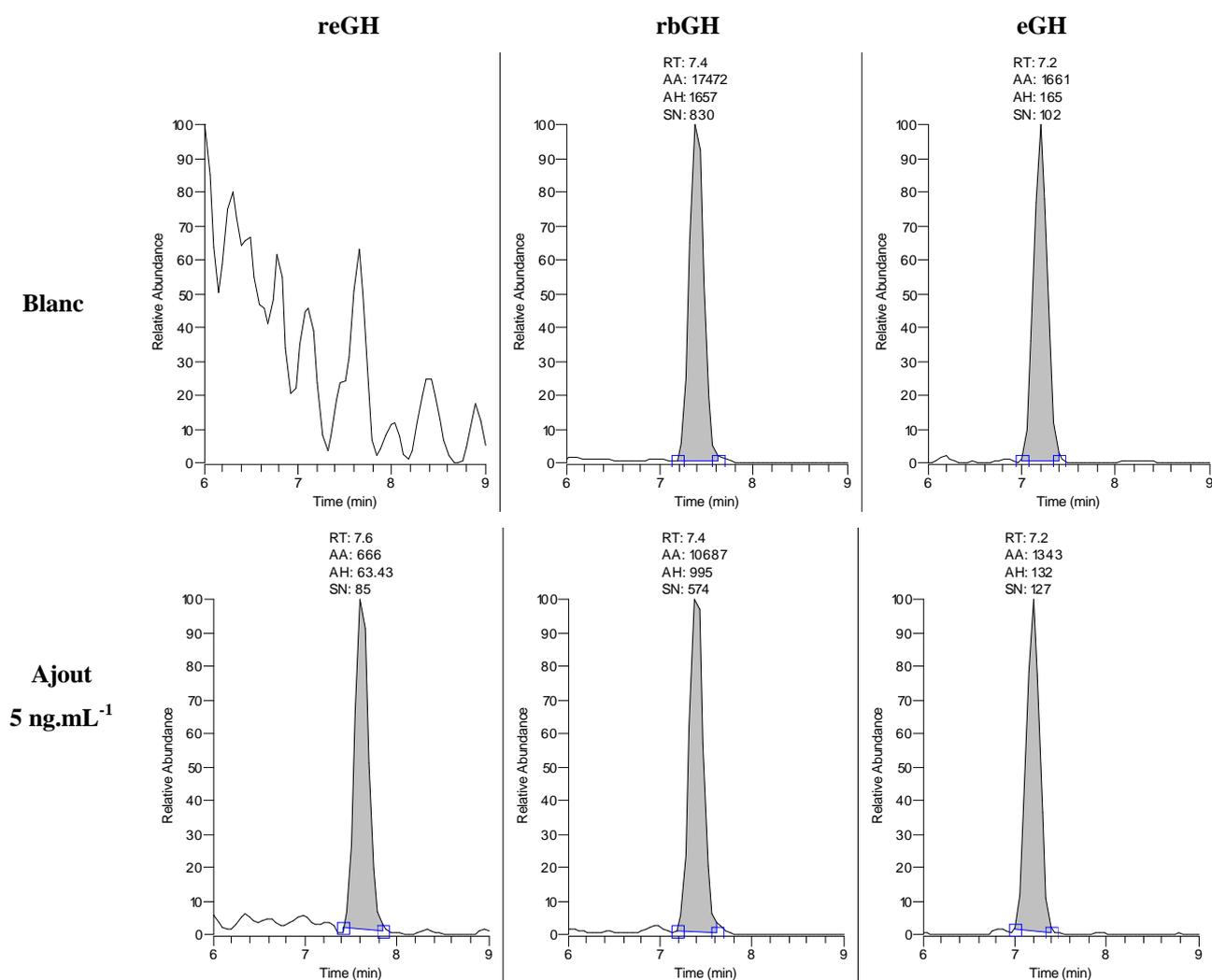


Figure III-46 : chromatogramme d'ions d'un ajout de reGH à 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans le plasma dans lequel apparaît la détection RP-HPLC/MS/MS en mode « balayage des ions produits » du peptide N-terminal de reGH (m/z 933,5), l'étalon interne (peptide N-terminal de rbGH, m/z 913) et le peptide N-terminal d'eGH (m/z 868) présent naturellement dans le plasma servant à réaliser la validation. Détection *via* un gradient composé d' $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 0,2 % AF et une colonne C4, 300Å, 2x250 mm, 5 μm couplée à un piège à ions linéaire (LTQ XL).

Tableau III-15 : concentrations en hormone de croissance équine naturellement présentes dans les 20 plasmas d'animaux sains ayant servi lors de la validation de la méthode

Age des chevaux	5 à 9 ans	10 à 20 ans
Effectifs	9	11
Concentrations ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	< 1 à 8	< 1 à 2

3.4.8. Premiers essais de quantification de l'hormone endogène par spectrométrie de masse

En parallèle de la validation de la méthode selon la décision 2002/657/CE, et compte tenu de la sensibilité de la méthode annoncée de 1 à 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, il a été décidé de confronter le protocole mis au point avec la détection de l'hormone endogène naturellement présente dans les 20 plasmas mis à disposition et dont les valeurs circulantes attendues sont compatibles avec les performances de la méthode développée. Pour obtenir la meilleure sensibilité de détection des peptides N-terminaux de reGH, eGH et de l'étalon interne, les identifications ont été réalisées en mode « balayage des ions produits » respectivement à partir des ions de m/z 933,5, 868,0, 913,0 correspondant aux peptides N-terminaux des hormones reGH, rbGH et eGH et reconstruction des chromatogrammes d'ions à partir des différents ions fils correspondants (Figure III-46). Sur le plasma blanc extrait, le peptide N-terminal de reGH n'est pas détecté tandis que l'étalon interne (rbGH = 100 ng.mL^{-1}) et l'hormone endogène sont identifiés à des temps de rétention très proches (7,4 et 7,2 min).

C'est la première fois que de l'hormone de croissance équine endogène est mesurée par spectrométrie de masse dans du plasma.

Sur le même plasma avec l'ajout à 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de reGH, une identification du peptide N-terminal de reGH a été réalisée au temps de rétention 7,6 min. Pour les deux purifications, réalisées avec plus d'une semaine d'écart, les temps de rétention pour l'étalon interne et l'hormone endogène sont identiques. Il est par conséquent possible par la stratégie analytique élaborée pour la détection directe de reGH dans le plasma de mesurer l'hormone de croissance naturellement présente dans les échantillons. Les informations collectées lors de ces essais de quantification de l'hormone endogène sont présentées dans le Tableau III-15. La population de chevaux utilisée pour la validation de la méthode a été divisée par deux. Un premier groupe de 9 chevaux de 5 à 9 ans a été constitué représentant la classe d'âge d'animaux les plus présents lors des compétitions hippiques et le second avec 11 chevaux de 10 à 20 ans. Les concentrations en eGH déterminées par spectrométrie de masse sont comprises entre moins de 1 et 8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le premier groupe et de l'ordre de 2 ou moins de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le second. Les résultats obtenus pour la population jeune, c'est-à-dire d'âge compris entre 5 et 9 ans sont en accord avec les informations de la littérature où il est fait état de concentrations de l'ordre de 1 à 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans le plasma pour le cheval sain (Thompson Jr *et al.*, 1992 ; Stewart *et al.*, 1993 ; Cahill *et al.*, 1994 ; Thompson Jr *et al.*, 1994 ; Christensen *et al.*, 1997 ; Kennedy *et al.*, 2002 ; Dart *et al.*, 2003 ; Borromeo *et al.*, 2005 ; Borromeo *et al.*, 2007).

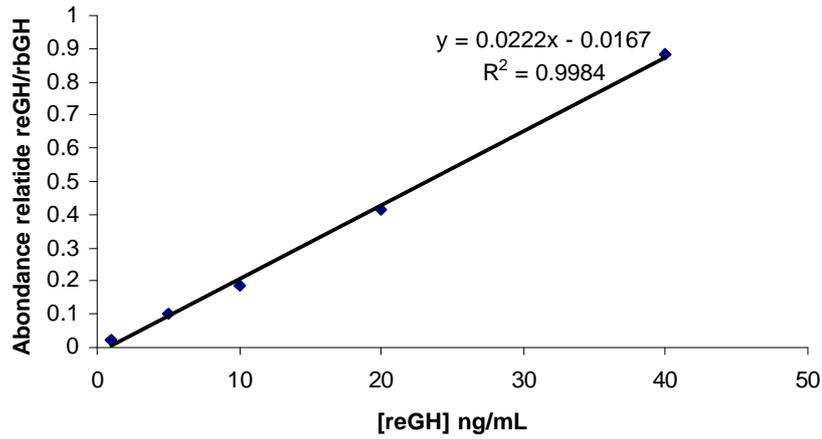


Figure III-47 : gamme de concentration de reGH dans le plasma (1 à 40 ng.mL⁻¹) obtenue par LC-MS/MS (piège à ions linéaire)

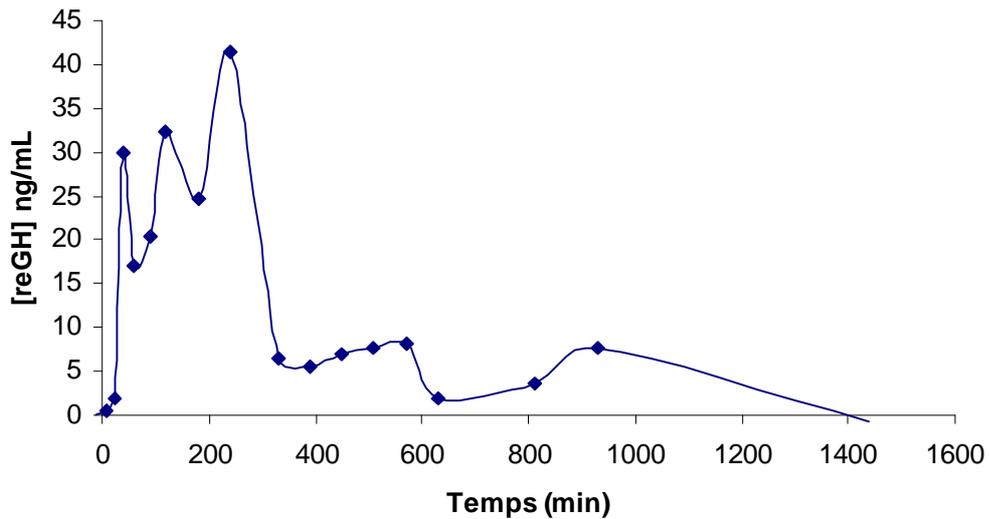


Figure III-48 : cinétique d'élimination de reGH dans le plasma après une seule injection (expérimentation 586). Dosage de l'hormone de croissance équine recombinante par LC-MS/MS (piège à ions linéaire). Dernier point détecté à 15h30.

Par conséquent, la méthode de dosage de l'hormone de croissance endogène par spectrométrie de masse peut être envisagée en parallèle d'une recherche d'hormone de croissance recombinante équine. La sensibilité de la méthode est donc bien en accord avec les concentrations physiologiques circulantes d'eGH.

3.5. Cinétique d'élimination de la molécule et temps de détection

L'expérimentation 586 a été réalisée pour déterminer la cinétique d'élimination de l'hormone de croissance équine recombinante dans le plasma après une seule injection d'EquiGen-5[®] (14 mg). L'ensemble des échantillons de l'expérimentation a été analysé pour déterminer les concentrations en reGH et eGH au moyen d'une gamme d'étalonnage de 1 à 40 ng.mL⁻¹ en reGH (Figure III-47). La droite d'étalonnage a été jugée acceptable pour quantifier les hormones de croissance présentes dans les échantillons ($R^2 = 0,9984$). La cinétique d'élimination expérimentale de reGH ainsi obtenue est présentée Figure III-48. Sur cette figure, une augmentation progressive de la concentration en reGH est mesurée pour atteindre un maximum de 42 ng.mL⁻¹ à 240 min (4 h) après l'injection. Les fluctuations de concentrations observées pendant les 4 premières heures sont supposées être soit liées à un effet de rétrocontrôle négatif possible de la molécule par l'organisme du cheval (neutralisation biologique) ou soit d'ordre analytique liée à l'ajout de rbGH dans l'échantillon pouvant modifier certains équilibres en solution de GH avec une protéine de transport.

Ensuite, à partir de 330 min (5h30), une diminution importante de la concentration plasmatique de reGH est observée pour atteindre 6 ng.mL⁻¹ et se stabilise entre 2 et 8 ng.mL⁻¹ jusqu'à 15h30 après l'administration. Les échantillons analysés à partir de 24 h n'ont pas permis de mettre en évidence l'administration de reGH en LC-MS/MS avec le piège à ions linéaire. Sur ce cheval de 17 ans, l'hormone de croissance endogène dosée dans chacun des échantillons a toujours été inférieure à 1 ng.mL⁻¹.

Considérant que le spectromètre de masse (piège à ions linéaire) pouvait être limitant dans l'obtention d'un temps de détection de reGH dans le plasma plus long, des essais avec le LTQ-Orbitrap[®] et le TSQ Quantum Ultra[®] de dernière génération ont été réalisés grâce à la mise à disposition de ces appareils par la société Thermo Scientific. Les résultats de détection en masse exacte du peptide N-terminal de reGH obtenus par le LTQ-Orbitrap[®] n'ont pas permis d'améliorer la détectabilité de la molécule. En revanche, à partir des mêmes échantillons, le peptide N-terminal caractéristique de reGH a été détecté à 24, 36 et 48 h en utilisant le triple quadripôle de dernière génération.

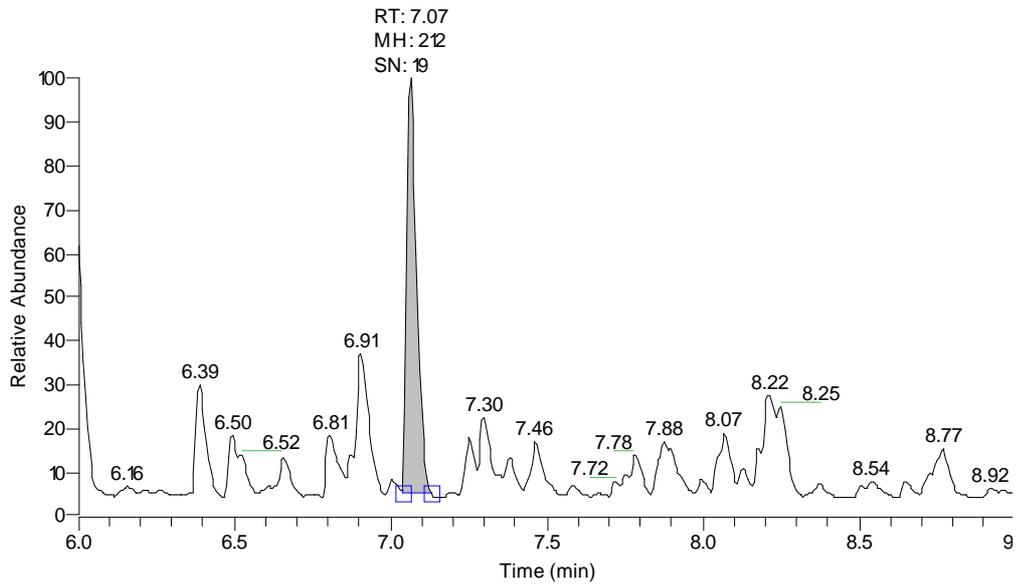


Figure III-49 : chromatogramme d'ions de la détection du peptide N-terminal de reGH dans le plasma après 48 heures. Détection par LC-MS/MS au moyen d'un triple quadripôle (TSQ Quantum Ultra). Suivi de m/z 933,4 > 794,4 + 1287,9 + 1288,9.

Le chromatogramme d'ions de la détection en mode « product scan » du peptide N-terminal de reGH dans le plasma à 48 h après administration par LC-MS/MS (QqQ) est présenté Figure III-49. La détection du peptide à 48 h par ce spectromètre de masse est expliquée par la stringence très élevée de détection des ions fils demandés (m/z 794,3, 1287,9, 1288,9) à $\pm 0,10$ unité de masse. Avec ces nouveaux paramètres de détection de reGH dans le plasma, il est possible de définir que le temps de détection de la molécule de reGH dans l'organisme du cheval (administration sous-cutanée) peut atteindre 48 h.

4. CONCLUSION DE LA SECONDE PARTIE

Les informations de concentrations basales en eGH, déterminées par RIA, à partir des plasmas blancs des expérimentations 497 et 498 ont permis de définir les objectifs *a minima* à atteindre en terme de sensibilité de détection de GH dans le plasma par une méthode directe, à savoir 10 ng.mL^{-1} . Grâce à la caractérisation des standards par électrophèse 1D et par spectrométrie de masse, leur pureté a été vérifiée et la masse des hormones de croissance a été obtenue par déconvolution du spectre de masse. Il a été déterminé une masse de 21756 Da pour l'eGH, 21885 pour la reGH et 21732 pour la pGH. Pour éviter une division trop importante du signal correspondant aux ions polychargés de ces molécules, l'identification et la discrimination des hormones de croissance ont été mises au point à partir de leur peptide N-terminal caractéristique dichargé. L'étude et l'analyse du peptide N-terminal spécifique de l'hormone de croissance équine recombinante par MS/MS a permis d'obtenir deux ions fils principaux de m/z 794 et m/z 1288.

La mise au point de la détection directe de reGH s'est effectuée sur la matrice plasma en comparant les performances obtenues pour 3 méthodes différentes de purification : l'extraction sur phase solide, l'immunoaffinité et l'électrophorèse bidimensionnelle. Des essais de purification de reGH dans l'urine ont été entrepris en utilisant des systèmes d'ultrafiltration avec différents seuils de coupure mais ils n'ont jamais permis d'aboutir à des résultats répétables. L'urine de cheval étant une matrice très complexe, avec une très importante variabilité inter-individuelle en terme de composition, il a été décidé de se focaliser entièrement sur la matrice plasma pour développer la méthode directe. La mise au point réalisée au cours de ce travail a permis de détecter successivement des ajouts de reGH dans le plasma à 100 ng.mL^{-1} par SPE puis par immunoaffinité, sans pouvoir obtenir des résultats probants par l'approche protéomique (E2D).

En raison des résultats préliminaires prometteurs de la détection directe de reGH dans le plasma à 50 ng.mL^{-1} en utilisant comme stratégie analytique la SPE C_4 , le travail de recherche et de développement de la méthode a été engagé dans cette stratégie et a permis d'aboutir à une limite de détection de 1 ng.mL^{-1} . Le protocole ainsi établi a été validé sur 20 plasmas d'animaux non traités, en suivant les critères de l'AORC et de la décision 2002/657/CE, en utilisant de l'hormone de croissance recombinante bovine comme étalon interne. La validation a permis d'aboutir après calcul à une limite de décision ($CC\alpha$) de dépistage de $0,2 \text{ ng.mL}^{-1}$ et de confirmation de $0,3 \text{ ng.mL}^{-1}$. Pour la capacité de détection ($CC\beta$), $0,4 \text{ ng.mL}^{-1}$ ont été calculés pour le dépistage et $0,7 \text{ ng.mL}^{-1}$ pour la confirmation. Les valeurs obtenues sont certainement légèrement surévaluées en raison de l'établissement de la gamme d'étalonnage avec des plasmas d'origines différentes de ceux utilisés pour la validation de la méthode.

Compte tenu de la limite de détection de reGH annoncée dans le plasma à 1 ng.mL^{-1} , la recherche de l'hormone endogène a été entreprise pour confirmer cette sensibilité. Les résultats obtenus en quantification de l'eGH à partir des plasmas blancs de la validation ont été en accord avec les données de la littérature, soit 1 à 8 ng.mL^{-1} , confirmant ainsi avec les concentrations physiologiques d'eGH chez les chevaux que les objectifs du développement de méthode étaient atteints en terme de sensibilité de détection dans le plasma. Le protocole ainsi élaboré a permis d'obtenir la première cinétique d'élimination de l'hormone de croissance recombinante dans un organisme vivant par une mesure directe par spectrométrie de masse. D'après cette cinétique, la concentration maximale de reGH dans le plasma est obtenue après 4 h puis une diminution progressive est observée avec un temps de détection maximal de reGH de 48 h après l'injection de la molécule au cheval.

CONCLUSION GÉNÉRALE

En raison de ses propriétés uniques en tant que promoteur de croissance, l'hormone de croissance a été particulièrement étudiée depuis près de 60 ans. Jusqu'à présent, les stratégies analytiques décrites dans la littérature et relatives à la mise en évidence des hormones de croissance n'apportent pas de réelles solutions pour confirmer de manière non ambiguë la présence de cette protéine dans les matrices biologiques. En effet, les travaux publiés traitant de la purification des hormones de croissance sont presque exclusivement dédiés à des quantités importantes de molécules se trouvant dans des hypophyses ou des cellules recombinantes et ne présentent donc pas les performances nécessaires pour atteindre les objectifs de sensibilité de détection de reGH à l'état de trace. Dans ce contexte, des tests de dépistage de l'administration frauduleuse des hormones de croissance ont été développés notamment par la mise en évidence de biomarqueurs secondaires tels que l'IGF-1, l'IGFBP-3 ou des anticorps anti-rGH.

Ce travail de thèse s'est inscrit dans ce cadre précis et s'est donc naturellement articulé autour de deux stratégies, permettant dans un premier temps le développement d'un protocole analytique novateur pour appliquer un dépistage « haut-débit » de l'administration frauduleuse d'hormone de croissance équine recombinante *via* la détection d'anticorps anti-reGH produits en réaction à un traitement par la reGH chez des chevaux de course. Puis dans un second temps, une nouvelle stratégie analytique combinant plusieurs techniques d'extraction et de purification a été élaborée pour confirmer la présence de la substance interdite sur matrice biologique plasma et sérum à des concentrations de l'ordre du ng.mL^{-1} .

Le dépistage des anticorps anti-reGH produits consécutivement à un traitement de chevaux par une reGH (EquiGen-5[®]) a été mis au point grâce à la réalisation de la purification des IgG notamment par l'introduction d'un procédé original impliquant l'acide caprylique. Cet acide permet l'élimination de près de 70 % des protéines contenues dans le plasma et le sérum. Les anticorps ainsi purifiés ont été testés par Western-Blot pour vérifier leur capacité de liaison avec la molécule de reGH. Les résultats obtenus ont permis de conclure que les anticorps anti-reGH produits consécutivement à une administration répétée de reGH (EquiGen-5[®]) étaient spécifiques. Ensuite, pour atteindre les objectifs de dépistage « haut-débit » des anticorps anti-reGH, un test ELISA et un test utilisant la technologie SPR-BIA ont été développés.

Ces méthodes ont montré qu'elles pouvaient permettre une détection des anticorps anti-reGH chez le cheval pendant 200 et 80 jours respectivement après le début du traitement, ceci avec une bonne répétabilité et spécificité. La mesure de la concentration en IGF-1 plasmatique réalisée sur ces mêmes échantillons n'a permis de suspecter un animal positif au dessus du seuil proposé de 860 ng.mL^{-1} que pendant une semaine qui plus est pendant le traitement. Au cours de ce travail, la méthode initialement développée a été miniaturisée permettant ainsi de diminuer le volume de prise d'essai de l'échantillon en le réduisant à $260 \mu\text{L}$. Le temps de préparation des échantillons a été raccourci et le travail réalisé exclusivement en microplaques a permis d'augmenter la capacité de traitement des échantillons d'un facteur 8. Le test ELISA de détection des anticorps anti-reGH a été appliqué sur 615 échantillons de plasma collectés chez des chevaux de courses. Deux échantillons ont été suspectés sur la base du seuil de décision $\text{DO}_{405\text{nm}} = 1,3$. Une enquête a été ouverte par la Fédération Nationale des Courses Françaises concernant les deux chevaux concernés.

Le travail de recherche et développement de la méthode directe de détection de reGH sur matrice biologique a conduit à explorer 3 stratégies analytiques différentes : l'extraction sur phase solide, l'immunoaffinité et l'électrophorèse bidimensionnelle basées toutes les 3 sur une détection finale du peptide N-terminal caractéristique de la forme recombinante de l'eGH par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Le peptide N-terminal caractéristique de reGH a été fragmenté et deux ions fragments ont été définis (m/z 794 et m/z 1288). Le protocole mis au point a été développé à partir de la SPE C_4 , technique très peu utilisée pour purifier des protéines entières et jamais citée dans la littérature dans une application de purification de l'hormone de croissance. L'optimisation des différents points clés du protocole : le volume de prise d'essai de l'échantillon, le pH de la précipitation au sulfate d'ammonium, le pourcentage de saturation de la précipitation, le choix de la cartouche SPE et les conditions de lavage et d'élution de l'analyte, les conditions de trypsinolyse, les conditions de reprise des peptides et l'optimisation des conditions de LC-MS/MS ont permis d'aboutir à une limite de détection de la reGH dans le plasma, pour une prise d'essai de 4 mL , de 1 ng.mL^{-1} .

C'est la première fois que de telles performances sont atteintes d'autant plus que la prise d'essai n'est pas très élevée si l'on s'en réfère aux données de la littérature rapportant la détection de rpGH dans du plasma de bovin à 10 ng.mL^{-1} à partir d'une prise d'essai de 10 mL .

Le protocole a ensuite été validé sur 20 plasmas de chevaux selon la décision 2002/657/CE et les critères de l'AORC en utilisant de l'hormone de croissance recombinante bovine comme étalon interne. La validation a permis d'aboutir après calcul à une limite de décision ($CC\alpha$) de dépistage de $0,2 \text{ ng.mL}^{-1}$ et de confirmation de $0,3 \text{ ng.mL}^{-1}$. Pour la capacité de détection ($CC\beta$), $0,4 \text{ ng.mL}^{-1}$ ont été calculés pour le dépistage et $0,7 \text{ ng.mL}^{-1}$ pour la confirmation.

Compte tenu des performances de la méthode développée, la recherche de l'hormone endogène dans les plasmas à disposition a été initiée. Les résultats obtenus ont non seulement permis d'identifier l'eGH mais aussi ont permis de confirmer que les objectifs du développement de la méthode étaient atteints. Le protocole ainsi élaboré a permis d'obtenir la première cinétique d'élimination de l'hormone de croissance dans un organisme vivant par une mesure directe par spectrométrie de masse. D'après cette cinétique, la concentration maximale de reGH dans le plasma après une administration sous-cutanée est obtenue 4 h après administration et est détectable jusqu'à 48 h après l'injection de la molécule au cheval.

En raison de l'homologie existant entre les GH des différentes espèces, le développement de la méthode sur le plasma de cheval peut être appliqué sans modification majeure à d'autres espèces animales telles que bovins ou porcins et à d'autres matrices telles que le lait en intégrant la complexité de cette matrice. Comme il a été indiqué dans la partie bibliographie de ce manuscrit, il n'est pas à exclure que des administrations hétérologues de GH soient pratiquées sur des animaux de production ou chez l'homme. La méthode de détection directe de l'administration frauduleuse d'hormone de croissance proposée semble pouvoir répondre à cette question en s'adaptant aux autres hormones de croissance par la mesure de leurs peptide N-terminaux caractéristiques par LC-MS/MS.

D'autre part, dans le contexte plus général de dépistage de l'administration frauduleuse d'hormones de croissance, il semble important de mettre en évidence un effet biologique de rGH plutôt que la molécule elle-même pour atteindre des temps de détection de l'administration frauduleuse de l'ordre de plusieurs jours à plusieurs semaines après traitement. De telles stratégies ont été initiées et sont basées sur l'étude des « empreintes biologiques » notamment grâce aux techniques « omiques » telles que la métabolomique et la transcriptomique pour tenter de définir après un retraitement statistique pertinent une discrimination non ambiguë entre une population d'animaux témoins et traités.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

*Selon la convention dite de Vancouver,
International Committee of Medical Journal Editors, 1991*

- Abellan R, Ventura R, Pichini S, Pascual J, Pacifici R, Di Carlo S, Bacosi A, Segura J and Zuccaro P. Evaluation of immunoassay for the measurement of insulin-like growth factor-I and procollagen III peptide, indirect biomarkers of recombinant human growth hormone misuse in sport. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2005;43(1):75-85.
- Aharonowitz Y and Cohen G. The microbiological production of pharmaceuticals. *Scientific American* 1981;245:140-152.
- Ankersen M, Hansen T, Ahnfelt-Ronne I and kappelgaard A. Growth hormone secretagogue: recent advances and applications. *Drug Discovery Today* 1999;4(11):497-506.
- Archer J, Kennan W, Gould M and Bremel R. Human growth hormone (hGH) secretion in milk of goats after direct transfer of the hGH gene into the mammary gland by using replication-defective retrovirus vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994;91:6840-6844.
- Ascacio-Martinez J and Barrera-Saldana H. Production and secretion of biological active recombinant canine growth hormone by *Pichia pastoris*. *Gene* 2004;340:261-266.
- Asimov C and Krouse N. The lactogenic preparations from anterior pituitary and the increase of milk yield of cows. *Journal of Dairy Science* 1937;20:389-393.
- Aston R, Cooper L, Holder A, Ivanyi J and Preece M. Monoclonal antibodies to human growth hormone can distinguish between pituitary and genetically engineered forms. *Molecular Immunology* 1985;22(3):271-275.
- Audran M, 2006. Thérapie génique et dopage. In: 6^{ème} Colloque National - Fondation Sport Santé, Paris.
- Aurich J, Kranski S, Parvizi N and Aurich C. Somatostatin treatment affects testicular function in stallions. *Theriogenology* 2003;60:163-174.
- Balitz G, Belz K, Wiersdorf A, Heberer T and Lampen A, 2006. Determination of IGF-1 in bovine plasma using LC/MS/MS. In: 5th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, Antwerp.
- Bauman D. Bovine somatotropine: review of an emerging animal technology. *Journal of Dairy Science* 1992;75:3432-3451.
- Bauman D, Eisemann J and Curie W. Hormonal effects on partitioning of nutrients for tissue growth: role of growth hormone and prolactin. *Federation Proceedings* 1982;41:2538.
- Baumann G. Growth hormone binding protein. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2001;14:355-375.
- Baumann G. Growth hormone-binding proteins (review). *P.S.E.B.M.* 1993;202:392-400.
- Baumann G, Amburn K and Buchanan T. The effect of circulating growth hormone-binding protein on metabolic clearance, distribution, and degradation of human growth hormone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1987;64:657-660.
- Baumann G, Amburn K and Shaw M. The circulating growth hormone (GH)-binding protein complex: a major constituent of plasma GH in man. *Endocrinology* 1988;122:976-984.

- Baumann G and Franck S. Metalloproteinase and the modulation of GH signaling. *Journal of Endocrinology* 2002;174:361-368.
- Baumann G, Shaw M and Amburn K. Regulation of plasma growth hormone-binding proteins in health and disease. *Metabolism* 1989;38:683-689.
- Bayol A, Bristow A, Charton E, Girard M and Jongen P. Somatotropin and its variants: structural characterization and methods of analysis. *Pharmeuropa Bio* 2004;1:35-45.
- Beaulieu E and Kelly P, 1990. *Hormones*, Paris.
- Becker G and Hsiung H. Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*. *FEBS* 1986;204(1):145-150.
- Beranova-Giorgianni S and Desiderio D. Mass spectrometry of human pituitary proteome: identification of selected proteins. *Rapid communications in mass spectrometry* 2000;14:161-167.
- Bercu B and Walker R. *Growth Hormone secretagogues*. Springer-Verlag 1996.
- Berumen L, Luna M, Carranza M, Martinez-Coria H, Reyes M, Carabez A and Aramburo C. Chicken growth hormone: further characterization and ontogenic changes of an N-glycosylated isoform in the anterior pituitary gland. *General and Comparative Endocrinology* 2004;139:113-123.
- Bewley T and Li C. Conformation of equine pituitary somatotropin. *International Journal of Peptide and Protein Research* 1987;29:589-595.
- Blevins D, Burke M, Good T, Harris P, Van Horne K, Simpson N and Yago L, 1993. *Sorbent Extraction Technology Handbook*. Varian Sample Preparation Products.
- Blokland M, Sterk S, van Ginkel L, Stephany R and Heck A. Analysis for endogenous and recombinant porcine somatotropine in serum. *Analytica Chimica Acta* 2003;438: 201-206.
- Bobin S, Popot M, Bonnaire Y and Tabet J. Approach to the determination of insulin-like-growth-factor-I (IGF-I) concentration in plasma by high-performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry: use of a deconvolution algorithm for the quantification of multiprotonated molecules in electrospray ionization. *The Analyst* 2001;126:1996-2001.
- Bollag D, Rozycki M and Edelstein S, 1996. *Protein Methods*. Wiley-Liss, New York.
- Bollengier F, Velkeniers B, Hooghe-Peters E, Mahler A and Vanhaelst L. Multiple forms of rat prolactin and growth hormone in pituitary cell subpopulations separated using a Percoll gradient system: disulphide-bridged dimers and glycosylated variants. *Journal of Endocrinology* 1989;120:201-206.
- Bonnaire Y, Bobin S, Popot M, Tabet J and Closset J, 1998. Studies of the structures of extractive and recombinant growth hormone from different species by mass spectrometry. In: B. Laviolette and M. Koupai-Abyazani (Eds), 12th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians. R & W Publications (Newmarket) Limited, Vancouver, British Columbia, Canada, p. 58-65.

- Borromeo V, Abbate F, Berrini A, Bartolone A and Secchi C. Monoclonal antibody capture fluorometric enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine growth hormone in plasma. *Veterinary Research Communications* 2005;29(Suppl. 2):173-176.
- Borromeo V, Berrini A, Gaggioli D and Secchi C. Heterophile antibody interference in a solid phase sandwich immunoassay for detection of equine growth hormone in plasma. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2007;115:1-9.
- Borromeo V, Berrini A, Secchi C, Brambilla G and Cantafora A. Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry for the detection of recombinant bovine growth hormone in sustained-release form. *Journal of Chromatography B* 1995; 669:366-371.
- Branden C and Tooze J, 1996. Introduction à la structure des protéines, Paris.
- Breier B, Bass J, Butler J and Gluckman P. The somatotrophic axis in young steers: influence of nutritional status on pulsatile release of growth hormone and circulating concentrations of insulin-like growth factor 1. *Journal of Endocrinology* 1986;111:209-215.
- Brook C and Marshall N, 1998. En bref...Endocrinologie. De Boeck Université, Paris.
- Buomono F, Ruffin D, Brendemeuhl J, Veenhuizen J and Sartin J. The effects of bovine somatotropine (bST) and porcine somatotropine (pST) on growth factor and metabolic variables in horses. *Journal of Animal Science* 1996;74(4):886-894.
- Burton J, McBride B, Kennedy B, Burton J, Elsasser T and Woodward B. Serum immunoglobulin profiles of dairy cows chronically treated with recombinant bovine somatotropin. *Journal of Dairy Science* 1991;74:1589-1598.
- Cahill C, van der Kolk H, Goode J and Hayden T. Development of homologous radioimmunoassays for equine growth hormone and equine prolactin and their application to the detection of circulating levels of hormone in horse plasma. *Reproduction Nutrition Development* 1994;34:309-328.
- Canova-Davis E, Baldonado I, Chloupek R, Ling V, Gehant R, Olson K and Gillece-Castro B. Confirmation by mass spectrometry of a trisulfide variant in methionyl human growth hormone biosynthesized in *Escherichia coli*. *Analytical Chemistry* 1996;68(22):4044-4051.
- Carter-Su C, Schwartz J and Smit L. Molecular mechanism of growth hormone action. *Annual Review of Physiology* 1996;58:187-207.
- Casanueva F. Physiology of growth hormone secretion and action. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 1992;21:483-517.
- Cascone O, Fukushima J, Mihajlovich V, Santomé J and Biscoglio De Jiménez Bonino M. An equine growth hormone molecular species lacking the 79-92 peptidic fragment. *International journal of peptide & protein research* 1992;39:397-400.
- Castigliero L, Lannone G, Grifoni G, Rosati R, Gianfaldoni D and Guidi A. Natural and recombinant bovine somatotropin, immunodetection with sandwich ELISA. *Journal of Dairy Research* 2006:1-7.

- Chang J, Ferguson T, Record P, Dickson D, Kiehl D and Kennington A. Improved potency assay for recombinant bovine somatotropine by high-performance size-exclusion chromatographie. *Journal of Chromatography A* 1996;736:97-104.
- Chang J, Kiehl D and Kennington A. Separation and Charaterization of the Tryptic Peptide Mapping of Recombinant Bovine Growth Hormone by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography Electrospray Mass Spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry* 1997;11:1266-1270.
- Chantalat L, Jones N, Korber F, Navaza J and Pavlovsky A. The crystal-structure of wild-type growth-hormone at 2.5 Å resolution. *Protein and Peptide Letters* 1995;2:333-340.
- Chen H, Wilhelmi A and Howard S. Purification and characteristics of porcine growth hormone. *The Journal of Biological Chemistry* 1970;245(13):3402-3406.
- Chen W, Wight D, Mehta B, Wagner T and Kopchick J. Glycine 119 of bovine growth hormone is critical for growth-promoting activity. *Molecular Endocrinology* 1991; 5:1845-1852.
- Chilliard Y. Long-term effects of recombinant bovine somatotropine (rbST) on dairy cow performances: a review. In *use of somatotropine in livestock production* ed. Elsevier Applied Science, New York: 61 1989.
- Chilliard Y, Colleau J, Disenhaus C, Lerondelle C, Mouchet C and Paris A. L'hormone de croissance recombinante : intérêt et risques potentiels de son utilisation pour la production laitière bovine. *INRA Productions Animales* 1998;11(1):15-32.
- Christensen R, Malinowski K, Scanes C and Hafs H. Pulsatile release of somatotropin related to meal feeding and somatotropin response to secretagogues in horses. *Journal of Animal Science* 1997;75:2770-2777.
- Chung L, Clifford D, Buckley M and Baxter R. Novel biomarkers of human growth hormone action from serum proteomic profiling using protein chip mass spectrometry. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006;91(2):671-677.
- Cisse M, Chilliard Y, Coxam V, Davicco M and Remond B. Slow release somatotropin in dairy heifers and cows fed two levels of energy concentrate.2. Plasma hormones and metabolites. *Journal of Dairy Science* 1991;74:1382-1394.
- Conde R, Paladini A, Santomé J and Dellacha J. Isolation, purification and characterization of equine growth hormone. *European Journal of Biochemistry* 1973;32:563-568.
- Cuneo R, Salomon F, Wiles C, Hesp R and Sönksen P. Growth hormone treatment in growth hormone-deficient adults. I. Effects on muscle mass and strength. *The American Physiological Society* 1991a:688-694.
- Cuneo R, Salomon F, Wiles C, Hesp R and Sönksen P. Growth hormone treatment in growth hormone-deficient adults. II. Effects on exercise performance. *The American Physiological Society* 1991b:695-700.
- Cuneo R, Salomon F, Wilmschurst P, Byrne C, Wiles C, Hesp R and Sonksen P. Cardiovascular effects of growth hormone treatment in growth hormone-deficient adults: stimulation of the renin-aldosterone system. *Clinical Sciences* 1991c;81:587-592.

- Dart A, Cries L, Jeffcott L, Hodgson D and Rose R. The effect of equine recombinant growth hormone on second intention wound healing in horses. *Veterinary Surgery* 2002;31:314-319.
- Dart A, Little C, Hughes C, Chu Q, Dowling B, Hodgson D, Rose R and Johnson K. Recombinant equine growth hormone administration: effects on synovial fluid biomarkers and cartilage metabolism in horses. *Equine Veterinary Journal* 2003;35:302-307.
- Daxenberger A, Breir B and Sauerwein H. Increased milk levels of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) for the identification of bovine somatotropin (bST) in treated cows. *The Analyst* 1998;123:2429-2435.
- de Boer G, Robinson P and Kennelly J. Hormonal responses to bovine somatotropin and dietary protein in early lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science* 1991;74:2623-2632.
- de Kock S, Rodgers J and Swanepoel B. Growth hormone abuse in the horse: preliminary assessment of a mass spectrometric procedure for IGF-1 identification and quantification. *Rapid communication in mass spectrometry* 2001a;(15):1191-1197.
- de Kock S, Rodgers J, Swanepoel B, Faustino-Kemp J, Jackson L, Houghton E, Noble G and Sillence M, 2000. Growth hormone abuse in the horse: establishment of an insulin-like growth factor-1 database. In: R. Williams, E. Houghton and J. Wade (Eds), 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians. R & W Publications (Newmarket) Limited, Cambridge, United Kingdom, p. 94-97.
- de Kock S, Rodgers J, Swanepoel B and Guthrie A. Administration of bovine, porcine and equine growth hormone to horse: effect on insulin-like growth factor-I and selected IGF binding proteins. *Journal of Endocrinology* 2001b;171:163-171.
- de Oliveira J, Soares C, Peroni C, Gimbo E, Camargo I, Morganti L, Bellini M, Affonso R, Arkaten R, Bartolini P and Ribela M. High-yield purification of biosynthetic human growth hormone secreted in *Escherichia coli* periplasmic space. *Journal of Chromatography A* 1999;852(2):441-50.
- De Palo E, Gatti R, Cappellin E, Schiraldi C, De Palo C and Spinella P. Plasma lactate, GH and GH-binding protein levels in exercise following BCAA supplementation in athletes. *Amino Acids* 2001;20:1-11.
- Delaunay N, Pichon V and Hennion M. Immunoaffinity solid-phase extraction for trace-analysis of low molecular mass analytes in complex samples. *Journal of Chromatography B* 2000;745:15-37.
- Deleuze S and Hanzen C. Cas clinique: traitement chirurgical de calculose vésicale par sphinctérotomie chez le jument. *Annales de Médecine Vétérinaire* 2001;145:373-376.
- Dellacha J and Sonenberg N. Purification of bovine growth hormone. *The Journal of Biological Chemistry* 1964;239(5):1515-1520.
- Donahue C, Kosik K and Shors T. Growth hormone is produced within the hippocampus where it responds to age, sex, and stress. *PNAS* 2006;103(15):6031-6036.
- Dorozynski A. Hormone scandal hits France. *The British Medical Journal* 1997;314:165.

- Du Vigneaud V, Ressler C, Swan C, Roberts C, Katsotannis P and Gordon S. The synthesis of an octapeptide amide with hormonal activity of oxytocin. *Journal of the American Chemical Society* 1953;75(19):4879-4880.
- Dubreuil P, Farmer C and Lapierre H. La somatocrine : son potentiel en production animale. *Le Médecin Vétérinaire du Québec* 1999; 29(2):81-88.
- Ellis S, Noda G, Simpson M and Evans H. Purity of growth hormone prepared by different methods. *The Journal of Biological Chemistry* 1954;209(2):779-787.
- Etherton T. Effets de la somatotropine sur les paramètres zootechniques de croissance chez le porc. *Le Médecin Vétérinaire du Québec* 1999a;29(2):77-80.
- Etherton T. Emerging strategies for enhancing growth : is there a biotechnology better than somatotropin ? *Domestic Animal Endocrinology* 1999b; 17:171-179.
- Etherton T and Bauman D. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiological Reviews* 1998;78(3):745-761.
- Evans H and Long J. The effect of the anterior lobe administered intraperitoneally upon growth, maturity, and oestrus cycles of the rat. *The Anatomical Record* 1921;21:62.
- Frasier S and Smith FJ. Antibodies to human growth hormone. *American Journal of Diseases of Children* 1966;112(5):383-388.
- Frenz J, Bourell J and Hancock W. High-performance displacement chromatography-mass spectrometry of tryptic peptides of recombinant human growth hormone. *Journal of Chromatography* 1990;512:299-314.
- Friesen H, Guyda H and Hardy J. Biosynthesis of human growth hormone and prolactin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1970;31(6):611-624.
- Fuh G, Mulkerrin M, Bass S, Mc Farland N, Brochier M, Bourell J, Light D and Wells J. The human growth hormone receptor: secretion, from *Escherichia coli* and disulfide bonding pattern of extracellular domain. *Journal of Biological Chemistry* 1990;265:311-315.
- Gallo L, Carnier P, Cassandro M, Mantovani R and Bittante G. Genetic and nongenetic effects on the response of Holstein cows to slow-release somatotropin injection. *Livestock Production Science* 1997; 49:269-275.
- Gautier A, 1979. Des principaux examens de laboratoire. Electrophorèse. In: Maloine (Ed) *Les examens de laboratoire en pratique vétérinaire*, Paris, p. 105-106.
- George H, L'Italien J, Pilacinski W, Glassman D and Krzyzek R. High-level expression in *Escherichia coli* of biologically active bovine growth hormone. *DNA* 1985;4(4):273-81.
- Gilpin D, Barrow R, Rutan R, Broemeling L and Herndon D. Recombinant human growth hormone accelerates wound healing in children with large cutaneous burns. *Annals of Surgery* 1994;220:19-24.
- Giorgianni F, Beranova-Giorgianni S and Desiderio D. Identification and characterization of phosphorylated proteins in the human pituitary. *Proteomics* 2004;4:587-598.

- Govers R, kerkhof P, Schwartz A and Strous G. Linkage of the ubiquitin-conjugating system and the endocytic pathway in ligand-induced internalization of growth hormone receptor. *The EMBO Journal* 1997;16(16):4851-4858.
- Graf L and Li C. On the primary structure of pituitary bovine growth hormone. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1974;56(1):168-176.
- Green J and Harris G. The neurovascular link between the neurohypophysis and adenohypophysis. *Journal of Endocrinology* 1947;5:136-146.
- Greespan F, Li C, Simpson M and Evans H. Bioassay of hypophyseal growth hormone: the tibia test. *Endocrinology* 1949;45:455-463.
- Grigorian A, Bustamante J, Hernandez P, Martinez A and Haro L. Extraordinarily stable disulfide-linked homodimer of human growth hormone. *Protein Science* 2005;14:902-913.
- Guidi A, Laricchia-Robbio L, Gianfaldoni D, Revoltella R and Del Bono G. Comparaison of a conventional immunoassay (ELISA) with a surface plasmon resonance-based biosensor for IGF-I detection in cow's milk. *Biosensors and Bioelectronics* 2001;16:971-977.
- Hames B, 1981. in *Gel Electrophoresis of Proteins. A practical Approach.*, London.
- Harlow E and Lane D, 1991. Appendice II. Techniques protéiques. In: Pradel (Ed) *Anticorps un manuel de laboratoire*, Paris, p. 658.
- Haro L, Cubriel A, Bustamante J, Flores R and Martinez A. Divalent metal cation chelators enhance chromatographic separation of structurally similar macromolecules: separation of human growth hormone isoforms. *Journal of Chromatography B* 1998;720:39-47.
- Haro L, Lewis U, Garcia M, Bustamante J, Martinez A and Ling N. Glycosylated human growth hormone (hGH): a novel 24 hDa hGH-N Variant. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996;228:549-556.
- Hepner F, Czasar E, Roitinger E and Lubec G. Mass spectrometrical analysis of recombinant human growth hormone (Genotropin[®]) reveals amino acid substitutions in 2% of the expressed protein. *Proteome Science* 2005;3(1):1-12.
- Herrera M, Leon G, Alvaro S, Meneses F, Lomonte B, Chippaux J and Gutierrez J. Factors associated with adverse reactions induced by caprylic acid-fractionated whole IgG preparations: comparison between horse, sheep and camel IgGs. *Toxicon* 2005;46:775-781.
- Heutmekers T, Bremer M, Haasnoot W and Nielen M. A rapid surface plasmon resonance (SPR) biosensor immunoassay for screening of somatotropins in injection preparations. *Analitica Chimica Acta* 2007;586:239-245.
- Hirel P, Schmitter J, Dessen P, Fayat G and Blanquet S. Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989;86:8247-8251.
- Hjertén S, Rosengren J and Pahlman S. Hydrophobic interaction chromatography. The synthesis and the use of some alkyl and aryl derivatives of agarose. *Journal of Chromatography* 1974;101:281-288.

- Hourd P and Edwards R. Current methods for the measurement of growth hormone in urine. *Clinical Endocrinology* 1994;40:155-170.
- Houseknecht K, Bauman D, Vernon R, Byatt J and Collier R. Insulin-like growth factors-I and -II, somatotropin, prolactin and placental lactogen are not acute effectors of lipolysis in ruminants. *Domestic Animal Endocrinology* 1996;13(3):239-249.
- Hwang L, Chen B, Lee P, Ho S and Liu J. Use of helper-free retroviral vector to direct a high expression of porcine growth hormone in mouse fibroblast cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 1992;16(2):171-81.
- Idelman S and Verdetti J, 2000. *Endocrinologie et communications cellulaires*, Les Ulis - France.
- Isaksson O, Lindahl A, Nilsson A and Isgaard J. Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. *Endocrine Reviews* 1987;8:426-438.
- Ishikawa M, Nimura A, Horikawa R, Katsumata N, Arisaka O, Wada M, Honjo M and Tanaka T. A novel specific bioassay for serum human growth hormone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000;85(11):4274-4279.
- Jeffcoate W. Can growth hormone therapy cause diabetes? *The Lancet* 2000;355:589-590.
- JO, 2003. Décret 2003-514. In: *Journal Officiel*, Vol. 139, p. 10159.
- Jo J, Lee T, Jeong H, Lee Y, Lee T, Park Y and Han K. Method for the production of porcine growth hormone using a synthetic gene in yeast cells. *United States Patent* 1996; 5:541.
- JOCE, 1998. Décision 98/58/EC. In: *Journal Officiel de la Communauté Européenne*, Vol. L221, p. 23-37.
- JOCE, 1999. Décision 1999/879/CE. In: *Journal Officiel de la Communauté Européenne*, Vol. L 331, p. 0071-0072.
- JOCE, 2002. Décision 2002/657/CE. In: *Journal Officiel de la Communauté Européenne*, Vol. L 221, p. 8-36.
- Johnson B, Shirokawa J, Hancock W, Spellman M, Basa L and Aswad D. Formation of isoaspartate at two distinct sites during *in vitro* aging of human growth hormone. *The Journal of Biological Chemistry* 1989;264(24):14262-14271.
- Johnson V and Maack T. Renal extraction, filtration, absorption, and catabolism of growth hormone. *The American Journal of Physiology* 1977;233(3):F185-F196.
- Jones J and Clemmons D. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Reviews* 1995;16(1):3-34.
- Jorgensen J, Pedersen S, Thuesen L, Jorgensen J, Moller J, Muller J, Skakkebbakk N and Christensen J. Long-term growth hormone treatment in growth hormone deficient adults. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 1991;125:449-453.
- Jung C, Lee Y, Jeong Y, Kim J, Kim Y and Kim H. Characterization of N^α-acetyl methionyl human growth hormone formed during expression in *Saccharomyces cerevisiae* with liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatographie B* 2005;814:53-59.

- Karlsen C, Balizs G, Juchelka D and Lampen A, 2006. Determination of the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio of growth hormone (somatotropine) using isotope ratio monitoring-LC/MS (irm-LC/MS). In: 17th International Mass Spectrometry Conference, Prague.
- Karlsson G, Gellerfors P, Persson A, Norén B, Edlund P, Sandberg C and Birnbaum S. Separation of oxidized and deamidated human growth hormone variants by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographie A* 1999;855:147-155.
- Keil-Dlouha V, Zylber N, Imhoff J, Tong N and Keil B. Proteolytic activity of pseudotrypsin. *FEBS* 1971;16(4):291-295.
- Kelly P, Djiane J, Postel-Vinay M and Edery M. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocrinology Review* 1991;12:235-251.
- Kennedy S, Thompson D, Pruett H, Burns P and Deghenghi R. Growth hormone response to a novel growth hormone-releasing tripeptide in horses: interaction with gonadotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and sulphiride. *Journal of Animal Science* 2002;80:744-750.
- kerkhof P, Govers R, Alves dos Santos C and Strous G. Endocytose and degradation of the growth hormone receptor are proteasome-dependant. *The Journal of Biological Chemistry* 2000;275(3):1575-1580.
- Kicman A, Miell J, Teale J, Powrie J, Wood P, Laidler P, Milligan P and Cowan D. Serum IGF-I and IGF binding protein 2 and 3 as potential markers of doping with human GH. *Clinical Endocrinology* 1997;47:43-50.
- Kim B and Brooks C. Isolation and characterization of phosphorylated bovine prolactin. *Biochemical Journal* 1993;296:41-47.
- Kirsh S, Widart J, Louette J, Focant J and De Paw E. Development of an absolute quantification method targeting growth hormone biomarkers using liquid chromatography coupled to isotope dilution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2007;1153:300-3006.
- Klindt J and Stone R. Porcine growth hormone and prolactin concentrations in the fetus and secretory patterns in the growing pig. *Growth* 1984;48:1-15.
- Kojima M, Hosoda H, Matsuo H and Kangawa K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for growth hormone secretagogue receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2001;12(3):118-122.
- Kopchick J and Andry J. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Molecular Genetics and Metabolism* 2000;71:293-314.
- Kurien B and Scofield R. Western blotting. *Methods* 2006;38:283-293.
- Kwa H, Van Der Bent E, Feltkamp C, Rümke P and Bloemendal H. Studies on hormones from anterior pituitary gland. I. Identification and isolation of growth hormone and prolactin from the "granular" fraction of bovine pituitary. *Biochimica et Biophysica Acta* 1965;3:447-465.
- Kyte J and Doolittle R. A simple method for displaying the hydrophobicity of amino acid residues in globular proteins. *Science* 1982;229:834-838.

- Laidler P, Cowan D, Houghton E, Kicman A and Marshall D. Discrimination of mammalian growth hormones by peptide-mass mapping. *Rapid communication in mass spectrometry* 1998;12:975-981.
- Laursen T. Clinical pharmacological aspects of growth hormone administration. *Growth Hormone & IGF Research* 2004;14:16-44.
- Le Cam A and Legraverend C. Mode d'action de l'hormone de croissance. *Médecine/Sciences* 1993;9:1352-1361.
- Lesniak M and Roth J. Regulation of receptor concentration by homologous hormone. Effect of human growth hormone on its receptor in IM-9 lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 1976;251(12):3730-3729.
- Li C and Evans H. The isolation of pituitary growth hormone. *Science* 1944;99(2566):183-184.
- Li C, Evans H and Simpson M. Isolation and properties of anterior hypophyseal growth hormone. *The Journal of Biological Chemistry* 1945;159:353-366.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A and Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951;193:265-275.
- Mair T and Osborn R. The crystalline composition of normal equine urine deposits. *Equine Veterinary Journal* 1990;22(5):364-365.
- Male D, 1999. *Immunologie. Aide-mémoire illustré*. De Boeck Université, Paris.
- Malinowski K, Christensen R, Konopka A, Scanes C and Hafs H. Feed intake, body weight, body condition score, musculation, and immunocompetence in aged mares given equine somatotropin. *Journal of Animal Science* 1997;75:755-760.
- Marshall D, Teale P, Kicman A, Laidler P, Cowan D, Davies H, George R and Houghton E, 1998. Approaches to the analysis of protein hormones: 2. Discrimination of mammalian growth hormones by peptide-mass mapping. In: B. Laviolette and M. Koupai-Abyazani (Eds), *12th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*. R & W Publications (Newmarket) Limited, Vancouver, British Columbia, Canada, p. 54-57.
- Marx W, Simpson M and Evans H. Bioassay of the growth hormone of the anterior pituitary. *Endocrinology* 1942;30:1-10.
- McKinney M and Parkinson A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *Journal of Immunological Methods* 1987;96(2):271-278.
- Merrifield B. The chemical synthesis of proteins. *Protein Science* 1951;5(9):1947-1951.
- Mollerach-Gobbi B, Retegui L and Pena C. Equine growth hormone. Detection of immunoreactive sequences using poly- and monoclonal antibodies. *International Journal of Peptide and Protein Research* 1990;35:105-110.
- Murphy L and Lazarus L. The mouse fibroblast growth hormone receptor: ligand processing and receptor modulation and turnover. *Endocrinology* 1984;115:1625-1632.

- Murthy G and McGarry E. Antibodies to porcine growth hormone induced by treatment with human growth hormone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1971;32(5):641-646.
- Nadal M, Thompson D and Kincaid L. Effect of feeding and feed deprivation on plasma concentrations of prolactin, insulin, growth hormone, and metabolites in horses. *Journal of Animal Science* 1997;75:736-744.
- Noble G, Houghton E, Roberts C, Faustino-Kemp J, de Kock S, Swanepoel B and Sillence M. Effect of exercise, training, circadian rhythm, age, and sex on insulin-like growth factor-1 in the horse. *Journal of Animal Science* 2007;85:163-171.
- Noble G and Sillence M, 2000. The potential of mediator hormones as markers of growth hormone abuse in racehorses. In: R. Williams, E. Houghton and J. Wade (Eds), 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians. R & W Publications (Newmarket) Limited, Cambridge, United Kingdom, p. 88-90.
- O'Farrell P. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 1975;250(10):4007-4021.
- Olivier L and Stockell Hartree A. Amino Acid Sequences around the cystine residues in horse growth hormone. *Biochemical Journal* 1968;109:19-24.
- Orian J, Lee C, Weiss L and Brandon M. The expression of a metallothionein-ovine growth hormone fusion gene in transgenic mice does not impair fertility but results in pathological lesions in the liver. *Endocrinology Review* 1989;124:455-463.
- Oroszlan P, Wicar S, Teshima G, Wu S, Hancock W and Karger B. Conformational effects in the reversed-phase chromatographic behavior of recombinant human growth hormone (rhGH) and N-methionyl recombinant human growth hormone (met-hGH). *Analytical Chemistry* 1992;64:1623-1631.
- Ouyang J, Long Q, Yang L and Wang X. Secretion expression of porcine growth hormone gene in insects cells. *Acta Veterinaria Zoologica Sinica* 2002;33:482-485.
- Ouyang J, Wang J, Deng R, Long Q and Wang X. High-level expression, purification, and characterization of porcine somatotropin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 2003;32(1):28-34.
- Ouyang J, Wei P, Yang L, Xie M, Yang J, Long Q and Wang X. Expression of porcine growth hormone gene in baculovirus vector system. *Clinical Virology* 2000;15:285-290.
- Palmiter R, Brinster R, Hammer R, Trumbauer M and Rosenfeld M. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 1982;300:611-615.
- Palmiter R, Norstedt G, Gelinas R, Hammer R and Brinster R. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science* 1983;222:809-814.
- Peel C and Bauman D. Somatotropin and lactation. *Journal of Dairy Science* 1987;70:474-486.
- Perez A, Pena C, Poskus E, Paladini A, Domene H, Martinez A and Heinrich J. Antibodies against animal growth hormones appearing in patients treated with human growth

- hormone: their specificities on growth velocity. *Acta Endocrinologica (Copenh)* 1985;110:24-31.
- Peroni C, Gout P and Bartolini P. Animal models for growth hormone gene therapy. *Current Gene Therapy* 2005;5:493-509.
- Pinel G. Hormones de croissance et sécrétagogues. Rapport bibliographique intermédiaire GROWTH/1RI010 2003.
- Pinel G, André F and Le Bizec B. Discrimination of recombinant and pituitary-derived bovine and porcine growth hormone by peptide mass mapping. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; 52:407-414.
- Pinel G, Buon R, Aviat F, Larre C, André-Fontaine G, André F and Le Bizec B. Recombinant bovine somatotropine misuse in cattle. Evaluation of Western blotting and 2D electrophoresis methods on biological samples for the demonstration of its administration. *Analytica Chimica Acta* 2005;529:41-46.
- Plotsky P and Vale W. Pattern of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into hypophyseal-portal circulation of the rat. *Science* 1985;230:461-463.
- Popii V and Baumann G. Laboratory measurement of growth hormone. *Clinica Chimica Acta* 2004;350:1-16.
- Popot M, Bobin S, Bonnaire Y, Delahaut P and Closset J. IGF-I plasma concentrations in non-treated horses and horses administered with methionyl equine somatotropin. *Research in Veterinary Science* 2001a;71:167-173.
- Popot M, Bobin S, Bonnaire Y, Monget P, Toquet M, Fortier G, Delahaut P and Closset J, 2000. Study related to the detection of equine recombinant growth hormone administration in the horse. In: R. Williams, E. Houghton and J. Wade (Eds), 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians. R & W Publications (Newmarket) Limited, Cambridge, United Kingdom, p. 98-104.
- Popot M, Bobin S, Bonnaire Y, Pirens G, Closset J, Delahaut P and Tabet J. High performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry for the determination of insulin-like growth factor-I in horse plasma. *Chromatographia* 2001b;54:737-741.
- Popot M, Bobin S, Bonnaire Y, Pirens G, Delahaut P, Lyazrhi F and Tabet J, 2002. IGF-I concentrations in the horse: determination of a threshold value. In: D. Hill and W. Hill (Eds), 14th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians. R & W Publications (Newmarket) Limited, Orlando, Florida, USA.
- Porath J, Sundberg L, Fornstedt N and Olson I. Salting-out in amphiphilic gels as a new approach to hydrophobic adsorption. *Nature* 1973;245:465-466.
- Poskus E, Zakin M, Fernandez H and Paladini A. Detection of immunologically active zones in equine growth hormone. *European Journal of Immunology* 1976;6(6):409-417.
- Prader A, Wagner H, Szeky J, Illig R, Touber J and Maingay D. Acquired resistance to human growth hormone caused by specific antibodies. *The Lancet* 1964;128:378-382.
- Price J, Jackson B, Noble G, Horner C, Jackson L, Eastell R, Houghton E and Sillence M, 2000. Growth hormone administration increases bone turnover in horses. In: R. Williams, E.

- Houghton and J. Wade (Eds), 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians. R & W Publications (Newmarket) Limited, Cambridge, United Kingdom, p. 91-93.
- Pursel V and Solomon M. Alteration of carcass composition in transgenic swine. *Food Revue International* 1993;9:423-439.
- Raben M. Treatment of pituitary dwarf with human growth hormone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1958;18:901-903.
- Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A and Lunardi J. Improvement of the solubilisation of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized gradients. *Electrophoresis* 1997;18:307-316.
- Rahmanian M, Thompson D and Melrose P. Immunocytochemical localization of prolactin and growth hormone in the equine pituitary. *Journal of Animal Science* 1997;75:3010-3018.
- Raweerith R and Ratanabanangkoon K. Fractionation of equine antivenom using caprylic acid precipitation in combination with cationic ion-exchange chromatography. *Journal of Immunological Methods* 2003;282:67-72.
- Ray J, Jones B, Liebhaber S and Cooke N. Glycosylated human growth hormone variant. *Endocrinology* 1989;125:566-568.
- Riggin R, Dorulla G and Miner D. A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for characterization of biosynthetic human growth hormone. *Analytical Biochemistry* 1987;167:199-209.
- Rochut N, Le Bizec B, Monteau F and André F. ESI-MS for the measurement of bovine and porcine somatotropins. *Analisis* 2000;28(4):280-284.
- Rojas G, Jimenez J and Gutierrez J. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon* 1994;32(3):351-363.
- Roth J, Glick S, Yalow R and Berson S. Antibodies to human growth hormone (hGH) in human subjects treated with hGH. *Journal of Clinical Investigation* 1964;43(6):1056-1065.
- Roupas P and Herington A. Intracellular processing of growth hormone receptors by adipocytes in primary culture. *Molecular & Cellular Endocrinology* 1988;57:93-99.
- Saugy M, Cardis C, Schweizer C, Veuthey J and Rivier L. Detection of human growth hormone doping urine: out of competition tests are necessary. *Journal of Chromatographie B* 1996;687:201-211.
- Saxena B and Henneman P. Preparation and properties of growth hormone from equine pituitary glands. *Endocrinology Review* 1966;78:561-567.
- Schams D, Winkler U, Schallenberger E and Karg H. Growth hormone and insulin-like growth factor-1 (somatomedin C) blood levels in cattle from birth trough sex maturation. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 1988;95(9):360-362.
- Scippo M, Degand G, Duyckaerts A and Maghuin-Rogister G. Identification des vaches laitières traitées à la somatotropine bovine. *Annales de Médecine Vétérinaire* 1997;141:381-390.

- Scopes R, 1981. In: Springer-Verlag (Ed) Protein Purification. Principles and Practice, New York.
- Seavey B, Singh R and Lewis U. Bovine Growth hormone, Evidence for two allelic forms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1971;43:189-195.
- Secchi C, Berrini A, Gaggioli D, Acocella F, Beattie J and Borromeo V. Monoclonal antibody capture fluorometric enzyme linked immunosorbent assay for detection of porcine growth hormone in plasma. *Analytica Chimica Acta* 1999;402:37-45.
- Secchi C, Berrini A, Gaggioli D and Borromeo V. Amino acid modifications in canine, equine and porcine pituitary growth hormones, identified by peptide-mass mapping. *Journal of Chromatography B* 2001;757:237-245.
- Secchi C, Biondi P, Berrini A, Simonic T and Ronchi S. A biotin-avidin sandwich enzyme-linked immunosorbent assay of growth hormone in bovine plasma. *Journal of Immunological Methods* 1988;110:123-128.
- Secchi C and Borromeo V. Structure and function of bovine growth hormone Bovine growth hormone as an experimental model for studies of protein-protein interactions. *Journal of Chromatography B* 1997;688:161-177.
- Sinha Y, Klemcke H, Maurer R and Jacobson B. Changes in the glycosylated and nonglycosylated forms of prolactin and growth hormone in lean and obese pigs during pregnancy. *Endocrinology* 1990;127:410-418.
- Smith L, Thompson D, French D and Leise B. Effects of recombinant equine somatotropin on wound healing, carbohydrate and lipid metabolism, and endogenous somatotropin responses to secretagogues in geldings. *Journal of Animal Science* 1999;77:1815-1822.
- Spitsberg V. A selective extraction of growth hormone from bovine pituitary gland and its further purification and crystallisation. *Analytical Biochemistry* 1987;160:489-495.
- Steinbuch M and Audran R. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1969;134(2):279-284.
- Stewart F, Goode J and Allen W. Growth hormone secretion in the horse: unusual pattern at birth and pulsatile secretion through to maturity. *Journal of Endocrinology* 1993;138:81-89.
- Stewart F and Tuffnell P. Cloning the cDNA for horse growth hormone and expression in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Endocrinology* 1991;6:189-196.
- Strobl J and Thomas M. Human growth hormone. *Pharmacological Reviews* 1994;46(1):1-34.
- Tannenbaum G and Ling N. The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology* 1984;115:1952-1957.
- Teh L, Murphy L, Huq N, Surus A, Friensen H, Lazarus L and Chapman G. Methionine oxidation in human growth hormone and human chorionic somatomammotropin. *The Journal of Biological Chemistry* 1987;262(14):6472-6477.

- Teshima G, Stults J, Ling V and Canova-Davis E. Isolation and characterization of succinimide variant of methionyl human growth hormone. *The Journal of Biological Chemistry* 1991;266(21):13544-13547.
- Thompson Jr D, DePew C, Ortiz A, Sticker L and Rahmanian M. Growth hormone and prolactin concentrations in plasma of horses: sex differences and the effects of acute exercise and administration of growth hormone-releasing hormone. *Journal of Animal Science* 1994;72:2911-2918.
- Thompson Jr D, Rahmanian M, DePew C, Burleigh D, DeSouza C and Colborn D. Growth hormone in mares and stallions: pulsatile secretion, response to growth hormone-releasing hormone, and effects of exercise, sexual stimulation, and pharmacological agents. *Journal of Animal Science* 1992;70:1201-1207.
- Tiselius A. Adsorption separation by salting out. *Arkiv för Kemi, Mineralogi Geologi* 26B 1948:1-5.
- Toutain P, Lassourd V, Popot M, Laroute V, Alvinerie M and Bonnaire Y. Urinary cortisol excretion in the resting and exercising horse. *Equine Veterinary Journal* 1995;18:457-462.
- Uchida H, Naito N, Asada N, Wada M, Ikeda M, Kobayashi H, Asanagi M, Mori K, Fujita Y, Konda K, Kusahara N, Kamioka T, Nakashima K and Honjo M. Secretion of authentic 20-kDa human growth hormone (20 kDa hGH) in *Escherichia coli* and properties of the purified product. *Journal of Biotechnology* 1997;55:101-112.
- Van Dorsselaer A, Bitsch F, Green B, Jarvis S, Lepage P, Bischoff R, Kold V and Roitsch C. Application of electrospray mass spectrometry to the characterization of recombinant proteins up to 44 kDa. *Biomedical and Environment Mass Spectrometry* 1990;19(11):692-704.
- Van Herpen H, Rijnberk A and Mol J. Production of antibodies to biosynthetic human growth hormone in the dog. *The Veterinary Record* 1994;134(7):171.
- Veldhuis J, Johnson M, Faunt M, Mercado M and Baumann G. Influence of the high-affinity growth hormone (GH)-binding protein on plasma profiles of free and bound GH and on the apparent half-life of GH. Modeling analysis and clinical application. *Journal of Clinical Investigation* 1993;91:629-641.
- Violand B, Schlitter M, Kolodziej E, Toren P, Cabonce M, Siegel N, Duffin K, Zobel J, Smith C and Tou J. Isolation and characterization of porcine somatotropin containing a succinimide residue in place of aspartate¹²⁹. *Protein Science* 1992;1:1634-1641.
- Vize P and Wells J. Isolation and characterization of porcine growth hormone gene. *Gene* 1987;55:339-344.
- Willeberg P. An international perspective on bovine somatotropine and clinical mastitis. *JAVMA* 1994;205(4):538-541.
- Wood P. Growth hormone: its measurement and the need for assay harmonization. *Annals of Clinical Biochemistry* 2001;38:471-482.

- Yun J, Li Y, Wight D, Portanova R, Selden R and Wagner T. The human growth hormone transgene: expression in hemizygous and homozygous mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology Medecine* 1990;194:308-313.
- Zakin M, Pena C, Poskus E, Stewart J and Paladini A. Immunological properties of two related fragments from human and equine growth hormones. *European Journal of Immunology* 1977;7(10):701-704.
- Zakin M, Poskus E, Langton A, Ferrara P, Santomé J, Dellacha J and Paladini A. Primary structure of equine growth hormone. *International Journal of Peptide and Protein Research* 1976;8:435-444.
- Zhan X and Desiderio D. A reference map of human pituitary adenoma proteome. *Proteomics* 2003;3:699-713.
- Zhan X, Giorgianni F and Desiderio D. Proteomics analysis of growth hormone isoforms in the human pituitary. *Proteomics* 2005;5:1228-1241.
- Zhao X, Groenewegen P, McBride B, Burton J and Elsasser T. Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-1 in bovine milk. *Canadian Journal of Animal Science* 1991;71:669-674.
- Zwickl C, Smith H, Tamura R and Bick P. Somatotropin antibody formation in cows treated with a recombinant bovine somatotropin over two lactations. *Journal of Dairy Science* 1990;73:2888-2895.

ANNEXES

Tampons utilisés avec la colonne d'immunoaffinité Amersham NHS-activée :

Tampon de couplage : NaHCO₃ 0,2 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3

Tampon A : éthanolamine 0,5 M; NaCl 0,5 M; pH 8,3

Tampon B : acétate de sodium 0,1 M; NaCl 0,5 M; pH 4,0

Tampon de stockage: Na₂HPO₄ 50 mM; NaN₃ 0,1%; pH 7,0

Tampons utilisés pour l'ELISA de détection des anticorps anti-reGH :

1- Acide chlorhydrique 0,5 M

Matériel requis :

- flacon 250 mL
- éprouvette 250 mL
- pipette P10000 + cônes adaptés

Dans une éprouvette de 250 mL, verser 240 mL d'eau ultrapure filtrée sur membrane de porosité 0,22 µm et ajouter 10 mL d'HCl 37 %. Mélanger et verser dans le flacon de 250 mL. Conservation à température ambiante.

2- Tampon de greffage (coating) pH 9,6

Matériel requis :

- flacon 200 mL
- balance de précision
- spatule
- capsules en PP jetables
- éprouvette 250 mL
- barreau aimanté
- agitateur magnétique

Dans une éprouvette de 250 mL verser environ 150 mL d'eau ultrapure filtrée sur membrane de porosité 0,22 µm, ajouter 0,34 g de Na₂CO₃ (MM : 106 g/mol). Laisser dissoudre sous agitation magnétique puis ajouter 0,57 g de NaHCO₃ (MM : 84 g/mol). Laisser dissoudre sous agitation magnétique puis compléter à 200 mL avec de l'eau ultrapure filtrée sur membrane de porosité 0,22 µm. Vérifier le pH par mesure indirecte pour éviter la propagation de pepsine dans la solution et stocker à 4°C dans un flacon en verre.

3- Tampon de lavage: PBS Tween 20 0,2 %, pH 7,4

Matériel requis :

- éprouvette 1 L
- flacon 1 L
- barreau aimanté
- agitateur magnétique
- pipette P5000 + cônes adaptés

Dans une éprouvette d'un litre, verser 900 mL d'eau ultrapure filtrée sur membrane de porosité 0,22 µm, verser la poudre Sigma pH 7,4. Placer sous agitation magnétique, laisser dissoudre puis ajouter 2 mL de Tween 20. Compléter à 1 L avec de l'eau ultrapure filtrée sur membrane de porosité 0,22 µm et transférer le tampon dans le flacon. Conserver à 4°C.

4- Tampon de dilution : PBS Tween 20 0,2 %, 2 % SeaBlock, pH 7,4

Matériel requis :

- éprouvette 1 L
- flacon 1 L
- barreau aimanté
- agitateur magnétique
- pipette P5000 + cônes adaptés
- pipette P10000 + cônes adaptés
- papier aluminium

Dans une éprouvette d'un litre, verser 900 mL d'eau ultrapure filtrée sur membrane de porosité 0,22 µm puis verser la poudre de PBS pH 7,4. Placer sous agitation magnétique, laisser dissoudre puis ajouter 2 mL de Tween 20 et 20 mL de Seablock. Compléter à 1 L d'eau ultrapure et transférer le tampon dans le flacon. Couvrir le flacon de papier aluminium pour protéger de la lumière et conserver à 4°C.

5- Seablock dilué au 1/50

Matériel requis :

- Falcon 50 mL
- pipette P10000 + cônes adaptés
- pipette P5000 + cônes adaptés

Dans un Falcon 50 mL mettre 15 mL de tampon de dilution et ajouter 300 μ L de Seablock.
Mélanger au vortex.

6- Tampon chromogène [Phosphate/Citrate/ABTS] pH 5, (5 mg/mL)

Matériel requis :

- flacon 200 mL
- balance de précision
- spatule
- capsules en PP jetables
- éprouvette 250 mL
- barreau aimanté
- agitateur magnétique
- tubes PP fermables 10 mL
- pipette P10000 + cônes

Dans une éprouvette de 250 mL, verser 150 mL d'eau ultrapure, verser 1,86 g d'acide citrique. Placer sous agitation magnétique, laisser dissoudre puis ajouter 3,71 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. Laisser dissoudre et ajouter 1 g d'ABTS. Compléter à 200 mL d'eau ultrapure. Laisser dissoudre et transférer dans le flacon. Aliquoter par 10 mL dans les tubes PP et stocker à -20°C .

DÉTECTION DE L'ADMINISTRATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE ÉQUINE RECOMBINANTE : Application au contrôle antidopage dans les courses hippiques.

L'hormone de croissance est une molécule protéique à activité anabolisante dont les propriétés peuvent être mises à profit pour améliorer les performances sportives des chevaux de courses et accroître la rentabilité de production des animaux d'élevage. Cependant, la législation est très stricte car l'utilisation de cette molécule ou de sa forme recombinante est interdite par le code des courses et les directives européennes en vigueur. Le problème est qu'il n'existe aucune méthode directe fiable de détection de cette molécule présente à l'état de trace dans le plasma ($\mu\text{g.L}^{-1}$) pour appliquer la réglementation. Dans ce contexte, les travaux de thèse ont permis d'aboutir à la mise au point de deux méthodes, l'une directe et l'autre indirecte, de détection de l'administration frauduleuse d'hormone de croissance équine recombinante (reGH) à des chevaux. La méthode de détection directe de la reGH a été obtenue avec la mise au point d'une nouvelle stratégie analytique basée sur la LC-ESI(+)-MS/MS en identifiant par spectrométrie de masse le peptide N-terminal caractéristique de la forme recombinante. La méthode de détection indirecte a quant à elle été développée par ELISA afin de mettre en évidence la production d'anticorps anti-reGH consécutive à un traitement par la reGH. Les résultats obtenus, à savoir le développement d'une méthode directe de détection de la GH dans le plasma à $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ et la détection d'anticorps anti-reGH pendant plus de cinq mois après traitement, permettent d'envisager des applications immédiates dans la lutte contre le dopage chez les chevaux de course et plus généralement chez les animaux de production.

Mots clés : hormone de croissance recombinante, courses hippiques, spectrométrie de masse, ELISA, anticorps

DETECTION OF RECOMBINANT EQUINE GROWTH HORMONE ADMINISTRATION: Antidoping application in horseracing.

The growth hormone is a peptidic molecule with anabolic activity potentially used to improve horse athletic efficiency and to increase the production profitability of farm animals. However, the legislation is very strict and the use of this molecule or its recombinant form is strictly forbidden by the races code and the European directives in force. The problem is that no reliable direct method exists to detect this molecule present at trace levels in plasma ($\mu\text{g.L}^{-1}$) in order to comply the regulation. In this context, this PhD thesis work enabled the development of two methods, one direct and one indirect, for the detection of recombinant equine growth hormone (reGH) misuse in horses. The direct detection method of reGH was obtained with the development of a new analytical strategy based on LC-ESI(+)-MS/MS through the identification by mass spectrometry of the N-terminal peptide, characteristic of the recombinant form. The indirect method was developed by ELISA to detect the production of anti-reGH antibodies consecutive to a treatment with reGH. The results obtained, namely the direct detection of reGH in plasma at $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ and the anti-reGH antibodies detection up to five months after treatment, allow to consider an immediate application in illegal administration of this molecule to race horses and food producing animals.

Key words : recombinant equine growth hormone, horseracing, mass spectrometry, ELISA, antibodies

Discipline : BIOCHIMIE

Jury : C. Tellier, J.-C. Tabet, M. Audran, D. Rondeau, Y. Bonnaire, B. Le Bizec.

Membres invités : G. André-Fontaine, G. Pinel.

Adresses de l'auteur:

- Laboratoire des Courses Hippiques (L.C.H.) - 15, rue de Paradis - 91370 Verrières-le-Buisson, France
- LABORatoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) École Nationale Vétérinaire de Nantes - Route de Gachet BP 50707 – 44307 Nantes, France