

VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2018 - Thèse n°073

***PRODUCTION D'UN STANDARD ANALYTIQUE DE
DPUC-MGP CANINE EN VUE DE LA MISE EN PLACE D'UNE
METHODE DE DOSAGE DE CETTE PROTEINE***

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)

et soutenue publiquement le 30 Octobre 2018
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

GILLET Romain



VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2018 - Thèse n°073

***PRODUCTION D'UN STANDARD ANALYTIQUE DE
DPUC-MGP CANINE EN VUE DE LA MISE EN PLACE D'UNE
METHODE DE DOSAGE DE CETTE PROTEINE***

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)

et soutenue publiquement le 30 Octobre 2018
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

GILLET Romain



Liste des Enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon (1er mars 2018)

Nom	Prénom	Département	Grade
ABITBOL	Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
ARCANGIOLI	Marie-Anne	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
AYRAL	Florence	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BECKER	Claire	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BELLUCO	Sara	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENAMOU-SMITH	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENOIT	Etienne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BERNY	Philippe	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BOULOCHER	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BOURDOISEAU	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
BOURGOIN	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BRUYERE	Pierre	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BUFF	Samuel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BURONFOSSE	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
CACHON	Thibaut	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CADORÉ	Jean-Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
CAROZZO	Claude	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CHABANNE	Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CHALVET-MONFRAY	Karine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DE BOYER DES ROCHES	Alice	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DEMONT	Pierre	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
DJELOUADJI	Zorée	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
ESCRIOU	Catherine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
FRIKHA	Mohamed-Ridha	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GALIA	Wessam	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Stagiaire
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
GONTHIER	Alain	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GRANCHER	Denis	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
GREZEL	Delphine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
HUGONNARD	Marine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
JANKOWIAK	Bernard	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Contractuel
JAUSSAUD	Philippe	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
JEANNIN	Anne	DEPT-ELEVAGE-SPV	Inspecteur en santé publique vétérinaire (ISPV)
JOSSON-SCHRAMME	Anne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences Contractuel
JUNOT	Stéphane	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
KODJO	Angeli	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
KRAFFT	Emilie	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
LAABERKI	Maria-Halima	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
LAMBERT	Véronique	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LE GRAND	Dominique	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
LEBLOND	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LEDOUX	Dorothee	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Stagiaire
LEFEBVRE	Sébastien	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences Stagiaire
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LEPAGE	Olivier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LOUZIER	Vanessa	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
MARCHAL	Thierry	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MATEOS	Stevana	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
MOISSONNIER	Pierre	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MOUNIER	Luc	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
PEPIN	Michel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
PIN	Didier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PONCE	Frédérique	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PORTIER	Karine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
POUZOT-NEVORET	Céline	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
PROUILLAC	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
REMY	Denise	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
RENE MARTELLET	Magalie	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
RIVES	Germain	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Contractuel
ROGER	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
SABATIER	Philippe	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
SAWAYA	Serge	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
SCHRAMME	Michael	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
SERGEANT	Delphine	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
THIEBAULT	Jean-Jacques	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
THOMAS-CANCIAN	Auréli	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
TORTEREAU	Antonin	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
VIGUIER	Eric	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
VIRIEUX-WATRELOT	Dorothee	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
ZENNER	Lionel	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur François MION

De la Faculté de Médecine de Lyon,
Qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,
Homages respectueux.

A Monsieur le Professeur Etienne BENOIT

De VetAgro Sup – Campus Vétérinaire de Lyon,
Pour m'avoir proposé ce sujet passionnant,
Pour m'avoir permis de m'initier à la gestion et la réalisation d'un projet de recherche,
Pour ses qualités humaines,
Qu'il trouve ici mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

A Madame le Docteur Emilie KRAFFT

De VetAgro Sup – Campus Vétérinaire de Lyon,
Qui nous fait l'honneur de participer à notre jury de thèse,
Qu'elle trouve ici l'expression de nos sincères remerciements.

A Madame le Docteur Virginie LATTARD

De VetAgro Sup – Campus Vétérinaire de Lyon,
Pour son soutien, ses conseils et sa disponibilité,
Pour les connaissances et le savoir-faire qu'elle nous a transmis à travers ce projet,
Qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Table des matières

Table des figures	13
Table des tableaux	15
Liste des abréviations	17
Introduction.....	19
PARTIE I – Synthèse bibliographique : Mise en évidence d’un lien entre insuffisance rénale chronique et MGP	21
I. Importance des maladies liées au déficit en vitamine K.....	23
A. Mise en évidence de maladies liées au déficit en vitamine K.....	23
1. Déficit en vitamine K et trouble de l’hémostase	23
2. Déficit en vitamine K et troubles de la minéralisation osseuse et vasculaire	24
B. Physiopathologie des maladies liées au déficit en vitamine K.....	24
1. Rappels de physiologie.....	24
a. L’hémostase	24
b. La physiologie du tissu osseux	26
c. La calcification vasculaire	26
2. La biologie de la vitamine K.....	29
a. Apport, absorption et métabolisme de la vitamine K.....	29
b. Consommation et recyclage de la vitamine K : le cycle de la vitamine K.....	30
3. La γ -carboxylation des glutamates des protéines vitamines K dépendantes	31
C. Principales origines des déficits en vitamine K.....	32
1. Défaut d’apport en vitamine K : la carence alimentaire	32
a. Chez l’Homme	32
b. Chez le Chien	33
2. Administration d’antagonistes de la vitamine K.....	34
a. Utilisations des antagonistes de la vitamine K	34
b. Pharmacocinétique des antagonistes de la vitamine K.....	35

c.	Mode d'action des antagonistes de la vitamine K.....	36
3.	Le cas particulier de l'insuffisance rénale chronique.....	37
a.	Mise en évidence de calcifications vasculaires et d'un déficit en vitamine K fonctionnelle en cas d'IRC	37
b.	Mécanismes menant à une diminution de la vitamine K fonctionnelle en cas d'insuffisance rénale chronique.....	37
c.	Conséquences cliniques de ces troubles.....	41
II.	La Matrix Gla Protein : une protéine γ -carboxylable vitamine K dépendante qui inhibe la calcification artérielle	42
A.	Caractérisation de la protéine	42
1.	Structures et modifications post-traductionnelles de la MGP	42
2.	Expression, synthèse et excrétion de la MGP	43
B.	Implications physiopathologiques de la MGP.....	44
1.	Etat de γ -carboxylation de la MGP et calcification vasculaire	44
a.	Calcification vasculaire et état de γ -carboxylation de la MGP au sein de la paroi vasculaire.....	44
b.	Calcification vasculaire et état de γ -carboxylation de la MGP dans le plasma ..	45
2.	Relation entre dpucMGP plasmatique et stade d'IRC.....	46
3.	Relation entre dpucMGP plasmatique et fonction rénale	47
4.	La dpucMGP plasmatique en indicateur de complications ?.....	48
PARTIE II – Travail personnel : Synthèse et purification d'une protéine dpucMGP canine recombinante.....		51
I.	Matériel et méthode	53
A.	Vérification de la séquence codante du gène MGP par séquençage.....	53
B.	Construction et clonage d'un plasmide recombinant pET28b(+)-dMGP.....	55
1.	Amplification par PCR et purification du gène dMGP optimisé	55
2.	Hydrolyse du plasmide pET28b(+) et du gène dMGP optimisé.....	56
3.	Ligation du plasmide pET28b(+) et du gène dMGP digérés.....	57

4.	Transformation bactérienne et clonage du plasmide recombinant pET28b–dMGP ..	58
C.	Expression du gène dMGP et purification de la protéine recombinante.....	59
1.	Transformation bactérienne et induction de l’expression du gène dMGP	59
2.	Purification protéique	59
II.	Résultats	61
A.	Séquence codante reconstruite du gène dMGP	61
B.	Séquence du plasmide recombinant pET28b(+)-dMGP	61
C.	Electrophorèse des produits de purification protéique.....	62
1.	Purification protéique sur le surnageant de lysat	62
2.	Purification protéique sur le culot de lysat	64
III.	Discussion	67
A.	Nature de la protéine purifiée	67
B.	Pureté de la dMGP synthétique	67
C.	Concentration et expression de la protéine synthétique purifiée	67
D.	Séquence de la protéine dMGP synthétisée	68
E.	Dosage de la dpucMGP canine avec le kit ELISA dpucMGP humaine	68
IV.	Conclusion.....	69
	Conclusion	71
	Bibliographie.....	73

Table des figures

Figure 1 : Formule chimique des vitamines K.....	23
Figure 2 : La cascade d'activation des facteurs de coagulation.....	25
Figure 3 : Organisation des cristaux d'hydroxyapatite.....	26
Figure 4 : Calcification ossiforme de la média d'une artère athérosclérotique chez l'Homme (Qiao et al, 2003).....	27
Figure 5 : Facteurs de régulation de la calcification vasculaire (Sage et al, 2010).....	28
Figure 6 : Le cycle de la vitamine K (Stafford et al., 2005)	30
Figure 7 : Fixation à la GGCX et modifications conformationnelles des PVKD au cours de leur γ -carboxylation.....	31
Figure 8 : Mode d'action des antagonistes de la vitamine K (Ansell et al, 2008).....	36
Figure 9 : Maladies cardiovasculaires chez les patients avec et sans IRC (Saran et al, 2018).....	39
Figure 10 : Causes de décès chez les patients en stade terminal d'IRC (Saran et al, 2018).....	39
Figure 11 : Structure primaire des protéines MGP humaine et canine.....	42
Figure 12 : Sites de modifications post-traductionnelles de la MGP humaine (Schurgers et al, 2008)	43
Figure 13 : Relation entre la concentration en dpucMGP plasmatique et le score de calcification chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (Aoun et al, 2017).....	45
Figure 14 : Concentration plasmatique en dpucMGP en fonction du stade d'IRC (Schurgers et al, 2010)	46
Figure 15 : Relation entre concentration en dpucMGP plasmatique et DFG (Puzantian et al, 2018 ; Schurgers et al, 2010).....	47
Figure 16 : Structure du gène MGP du chien	53
Figure 17 : Amorces et fragments obtenus par PCR sur le gène dMGP	54
Figure 18 : Séquences des exons du gène dMGP, obtenues par la méthode SANGER.....	54
Figure 19 : Organisation du gène dMGP optimisé au sein du plasmide pUC57	55
Figure 20 : Amorces et fragment obtenu par PCR sur le plasmide pUC57-dMGP.....	55
Figure 21 : Produits de l'hydrolyse par les enzymes de restriction NdeI et Sall	56
Figure 22 : Ligation du plasmide pET28b(+) et de l'insert dMGP optimisé	57
Figure 23 : Protocole de transformation bactérienne.	58
Figure 24 : Séquence codante reconstruite du gène dMGP.....	61
Figure 25 : Séquence codante du plasmide recombinant pET28b(+)-dMGP.....	61

Figure 26 : Protéine recombinante obtenue après traduction de la séquence codante du pET28b(+)-dMGP et comparaison avec la protéine dMGP réelle.....	62
Figure 27 : Electrophorèse (SDS-PAGE) de l'échantillon de surnageant de lysat et des échantillons de purification sur colonne de nickel du surnageant.....	63
Figure 28 : Electrophorèse (SDS-PAGE) des échantillons après lyse bactérienne	64
Figure 29 : Evolution de l'absorbance UV en sortie de colonne de nickel au cours de la purification.....	65
Figure 30 : Electrophorèse (SDS-PAGE) de l'échantillon de solubilisation du culot de lysat et des échantillons de purification sur colonne de nickel du solubilisé	66

Table des tableaux

Tableau I : Apport quotidien adéquat en phylloquinone chez l'Homme en fonction de l'âge (Shearer et al, 2009)	33
Tableau II : Apport recommandé en vitamine K chez le Chien (National Research Council, 2001).....	33
Tableau III : Utilisations des antagonistes de la vitamine K en médecine humaine et en tant que raticide anti-coagulant.....	34
Tableau IV : Polarité et charge des acides aminés constituant les protéines MGP humaine et canine	42
Tableau V : Concentration en dpucMGP plasmatique en fonction du stade d'IRC chez l'Homme (Kurnatowska et al, 2016).....	47
Tableau VI : Supplémentation en vitamine K et diminution de la dpucMGP plasmatique chez des patients atteints d'IRC (Caluwé et al, 2014).....	49
Tableau VII : Concentration et pureté du produit d'amplification PCR après purification sur gel d'agarose	56
Tableau VIII : Concentration et pureté des produits d'hydrolyse par NdeI et Sall après purification.....	57
Tableau IX : Concentration et pureté du plasmide extrait d'une culture positive après transformation avec le produit de ligation pET28b(+)-dMGP	58

Liste des abréviations

ADN = acide désoxyribonucléique

ARNm = acide ribonucléique messenger

AVK = antagonistes de la vitamine K

BGP = bone gla protein = ostéocalcine

BMP = bone morphogenetic protein

DFG = débit de filtration glomérulaire

GGCX = γ -glutamyl carboxylase

IPTG = isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

IRC = insuffisance rénale chronique

MGP = matrix gla protein

dmGP = MGP de l'espèce canine

dpucMGP = MGP non γ -carboxylée et non phosphorylée

ucMGP = MGP non γ -carboxylée

PAGE = gel d'électrophorèse en polyacrylamide

PCR = réaction de polymérisation en chaîne

PVKD = protéine vitamine K dépendante

SDS = dodécylsulfate de sodium

SID = semel in die = une fois par jour

VKOR = vitamine K époxyde réductase

Introduction

La vitamine K et les protéines vitamine K dépendantes ont tout d'abord été découvertes et connues pour leur importance dans l'hémostase secondaire avec la cascade d'activation des facteurs de coagulation. Il a plus tard été mis en évidence qu'elles tiennent un rôle dans la régulation d'autres fonctions de l'organisme, telles que la régulation de la minéralisation osseuse et vasculaire. (Fusaro et al., 2015 ; Gage et al., 2006)

La Matrix Gla Protein (MGP) est une protéine vitamine K dépendante connue pour inhiber la calcification vasculaire une fois activée par γ -carboxylation grâce à la vitamine K. Chez l'Homme et le Rat, de récentes études mettent en évidence que l'insuffisance rénale chronique est à l'origine d'un déficit en vitamine K fonctionnelle : en particulier, l'insuffisance rénale chronique est associée à une calcification vasculaire anormale réversible par administration de vitamine K (Kaesler et al., 2014), ainsi qu'à une augmentation de la concentration plasmatique en MGP non carboxylée (dpucMGP) (Schurgers et al., 2010). Le suivi de la concentration plasmatique en dpucMGP apparaît ainsi intéressant dans l'évaluation du statut vitamine K et le suivi global des patients atteints d'IRC. (Fusaro et al., 2017b)

L'insuffisance rénale chronique est une maladie fréquente en espèce canine, mais nous disposons actuellement de peu d'outils permettant de déterminer si elle y est associée à des calcifications vasculaire anormales et à une diminution de la γ -carboxylation des protéines vitamine K dépendantes, à l'instar de ce qui est observé chez l'Homme et le Rat. C'est pourquoi nos travaux ont visé à produire un standard analytique de la dpucMGP plasmatique canine.

Pour ce faire, nous avons choisi de réaliser la synthèse et la purification d'une protéine recombinante par *E. coli* avec le plasmide pET28b(+). Cette protéine nous permettra d'évaluer les méthodes de dosage immunologique, en particuliers les méthodes dosant la dpucMGP humaine, ou de développer un anticorps polyclonal anti-dpucMGP canine.

PARTIE I – Synthèse bibliographique :
Mise en évidence d'un lien entre
insuffisance rénale chronique et MGP

I. Importance des maladies liées au déficit en vitamine K

A. Mise en évidence de maladies liées au déficit en vitamine K

Les vitamines K (figure 1) forment un groupe de vitamines liposolubles nécessaires aux modifications post-traductionnelles de certaines protéines, permettant leur activité biologique. Le rôle le plus connu de la vitamine K est le rôle historique qu'elle tient dans l'hémostase, avec l'activation des facteurs de coagulation II, VII, IX et X, mais des travaux plus récents ont montré son importance plus vaste, notamment avec son implication dans la régulation de la minéralisation osseuse et vasculaire. (Fusaro et al., 2017a)

1. Déficit en vitamine K et trouble de l'hémostase

Au début du XX^{ème} siècle, les travaux du biochimiste danois Carl Peter Henrik Dam sur le cholestérol le conduisent à nourrir des poulets avec une alimentation pauvre en stérols. Après plusieurs semaines de ce régime apparaissent des hémorragies persistantes, même après administration de cholestérol. Il conclut qu'un stérol autre que le cholestérol et nécessaire à la coagulation sanguine est absente de ce régime, et met ainsi en évidence l'existence d'une « *Koagulationsvitamin* », littéralement « vitamine de la coagulation » : cette vitamine reçoit de fait la lettre K du « *Koagulation* » allemand.

En 1939 a lieu la première synthèse chimique de vitamine K, par le biochimiste américain Edward Doisy. Les travaux de Dam et Doisy sur la vitamine K leur valent l'obtention du prix Nobel de médecine 1943.

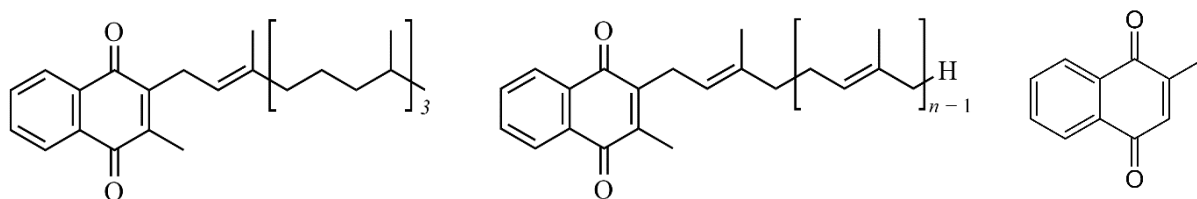


Figure 1 : Formule chimique des vitamines K
De gauche à droite : Phylloquinone (vitamine K1), Ménaquinone-n (vitamine K2) et Ménadione (vitamine K3)

2. Déficit en vitamine K et troubles de la minéralisation osseuse et vasculaire

Des études plus récentes soulignent que la vitamine K intervient dans la régulation de la minéralisation osseuse et de la minéralisation vasculaire.

En effet, les hommes (sains ou atteints de maladie rénale chronique) recevant un antagoniste de la vitamine K (la warfarine) durant au moins un an présentent un risque augmenté de fracture vertébrale. Cette observation n'est toutefois pas valable pour les femmes, chez qui le risque de fracture vertébrale n'est pas significativement augmenté par la prise de warfarine sur le long terme (Fusaro et al., 2015 ; Gage et al., 2006). Également, les hommes traités avec de la warfarine présentent un risque plus élevé de calcification aortique et iliaque et de calcification des artères coronaires. (Fusaro et al., 2015)

B. Physiopathologie des maladies liées au déficit en vitamine K

1. Rappels de physiologie

a. L'hémostase

L'hémostase se décompose en deux phases : l'hémostase primaire, qui mène à la formation du clou plaquettaire, est indépendante de la vitamine K ; l'hémostase secondaire, menant à la formation de fibrine via la cascade de la coagulation, repose quant à elle en partie sur des facteurs de coagulation vitamine K dépendants : la prothrombine (facteur II), la proconvertine (facteur VII), le facteur anti-hémophilique B (facteur IX) et le facteur de Stuart (facteur X). Une fois activés par γ -carboxylation, ces facteurs peuvent chélater le Ca^{2+} , dont les deux charges positives participent à former un réseau entre facteurs de coagulation et groupements phosphates des phospholipides membranaires apparus sur l'agrégat plaquettaire après inversion des membranes, renforçant le maillage issu de la cascade de coagulation.

La cascade de la coagulation est classiquement décomposée en deux voies initiales, dites intrinsèque et extrinsèque, activant toutes deux le facteur Xa et ainsi la voie commune finale et la formation de fibrine à partir du fibrinogène (figure 2). La fibrine, protéine insoluble (contrairement au fibrinogène), forme alors un maillage emprisonnant les cellules sanguines : c'est la coagulation.

La fibrine, facteur Ia de coagulation, est obtenue par activation du fibrinogène (facteur I) par la thrombine, facteur IIa. La thrombine est issue de l'activation de la prothrombine (facteur II) par le complexe enzymatique prothrombinase, composé du facteur Xa, du facteur Va, du Ca^{2+} et des phospholipides tissulaires et plaquettaires. La thrombine, en plus d'activer la fibrine dans cette voie commune finale de la cascade, permet également l'activation des facteurs XIa, VIIIa, et Va, stimulant la cascade de la coagulation en amont.

Lorsque l'intégrité de la paroi vasculaire est compromise, le facteur tissulaire (« TF »), exprimé par les fibroblastes, est exposé à la circulation sanguine. Le facteur VII entre en contact avec le facteur tissulaire, formant le complexe activé TF-FVIIa. Le TF-FVIIa active à son tour le facteur X en facteur Xa, déclenchant l'entrée dans la voie commune.

En cas de contact avec les structures sous-endothéliales, le facteur XII est activé en facteur XIIa. Le facteur XIIa active, en présence de Ca^{2+} , le facteur XI en facteur XIa, qui active quant à lui le facteur IX en IXa. Le facteur IXa, associé au facteur VIIIa (activé par les premières traces de thrombine) et au Ca^{2+} , permet l'activation du facteur X en facteur Xa, renforçant l'activation de la voie commune.

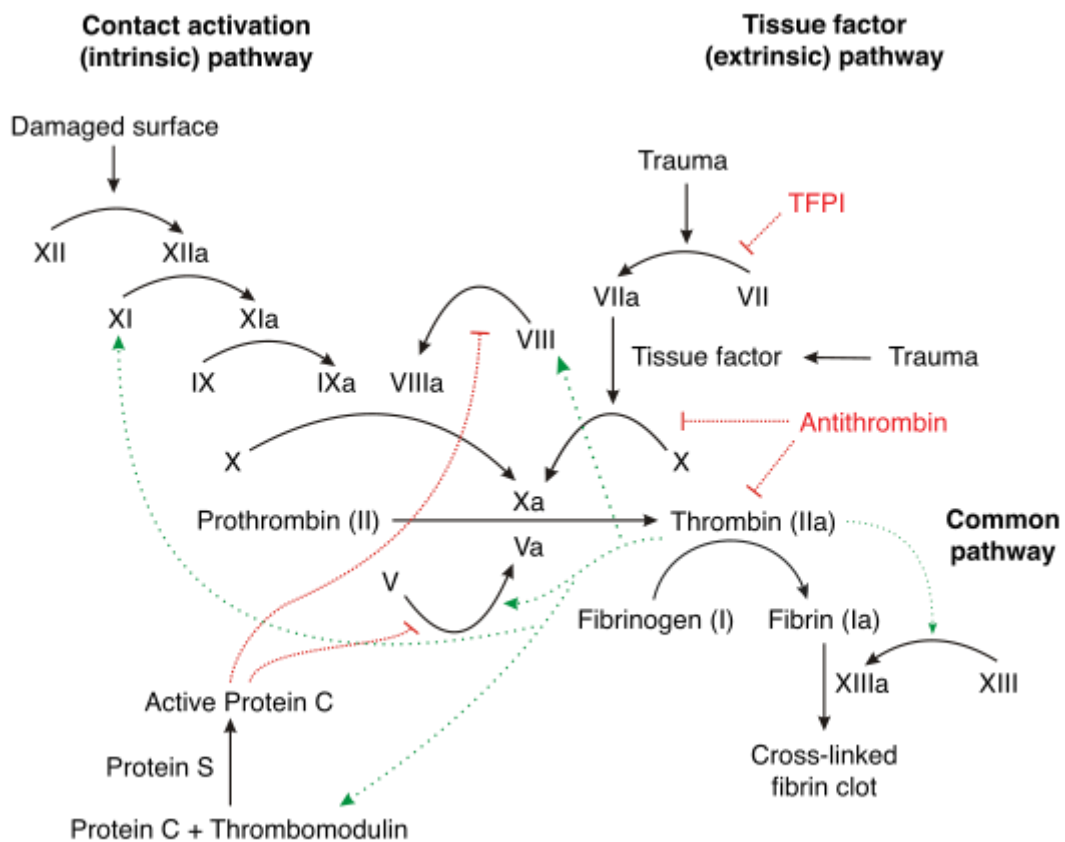


Figure 2 : La cascade d'activation des facteurs de coagulation

b. La physiologie du tissu osseux

La minéralisation osseuse est permise par la formation de cristaux d'hydroxyapatite de calcium $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (figure 3) au sein de la matrice collagénique, constituant la matrice osseuse.

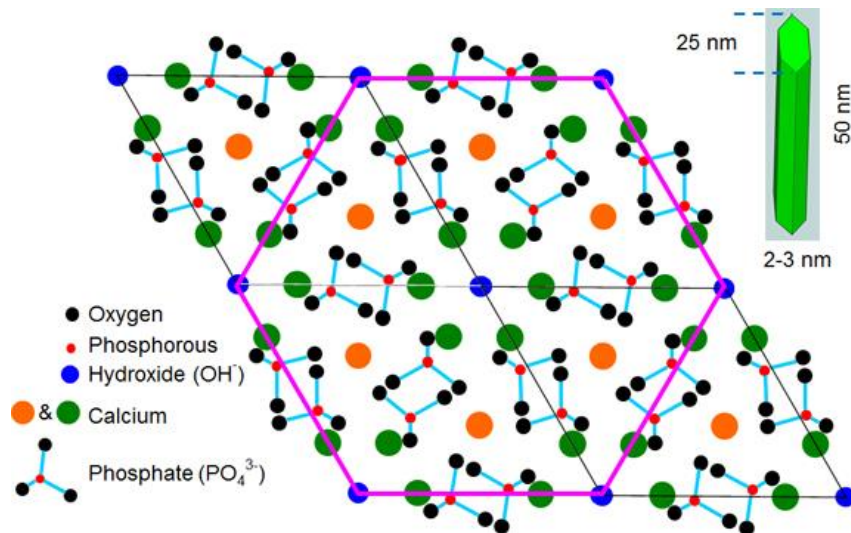


Figure 3 : Organisation des cristaux d'hydroxyapatite

L'intégration des cristaux d'hydroxyapatite à la matrice est permise par une protéine vitamine K dépendante : l'ostéocalcine (ou Bone Gla Protein, BGP), produite par les ostéoblastes et les odontoblastes sous l'action de la vitamine D, promoteur de l'expression du gène BGP. La BGP doit cependant être activée par γ -carboxylation pour être fonctionnelle : une fois γ -carboxylée, la BGP peut en effet capter les ions Ca^{2+} et permettre la formation des cristaux d'hydroxyapatite de calcium. Par ailleurs, il est montré que les concentrations en BGP carboxylée et non γ -carboxylée sont un bon indice d'exploration de la santé osseuse. (Shiraki, 2015 ; Zoch et al., 2016)

c. La calcification vasculaire

La calcification vasculaire se présente sous des formes variées : la minéralisation pathologique peut avoir lieu au sein de l'intima ou de la média des vaisseaux sanguins, mais également au niveau des valves cardiaques. (Wu et al., 2013)

L'examen d'artères et de valves athérosclérotiques calcifiées chez l'Homme met en évidence que la calcification vasculaire suit la même organisation que l'ostéogénèse : en effet, le dépôt minéral présente la même proportion de calcium et de phosphate qu'au sein de la matrice osseuse, et 10 à 20% des vaisseaux et valves athérosclérotiques sont le siège du

développement de calcifications architecturalement identiques à l'os : le dépôt minéral est constitué de matrice osseuse (ostéoïde), composée de collagène I, d'ostéopontine, de sialoprotéine osseuse, d'ostéocalcine, de fétuine et de Matrix Gla Protein ; le contingent cellulaire est composé d'ostéoblastes, ostéoclastes, chondroblastes, chondroclastes, ostéocytes, lymphocytes et cellules vasculaires (figure 4). (Hunt et al., 2002 ; Qiao et al., 2003 ; Sage et al., 2010)

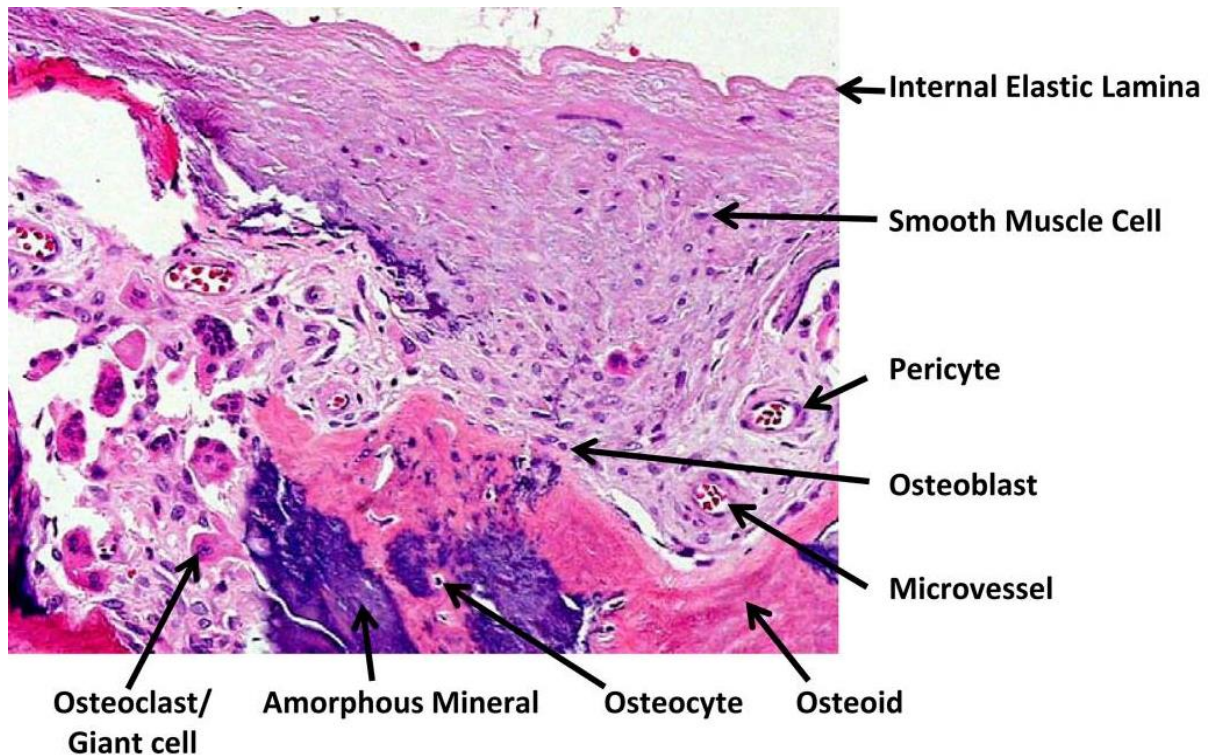


Figure 4 : Calcification ossiforme de la média d'une artère athérosclérotique chez l'Homme (Qiao et al, 2003)
Coupe histologique ; coloration à l'hématoxyline et à l'éosine, MO x100

Cette ostéoformation ectopique repose en fait sur la capacité des cellules musculaires lisses à se transdifférencier ou à se dédifférencier puis se redifférencier en cellules ostéochondrogéniques, aptes à synthétiser la matrice osseuse (Chen and Moe, 2015 ; Sage et al., 2010). La formation de vésicules matricielles est nécessaire à la calcification vasculaire : ces vésicules permettent la concentration du calcium et du phosphate, et ainsi leur cristallisation (Disthabanchong, 2012). Également, des corps apoptotiques issus des cellules musculaires lisses vasculaires sont observés dans les vaisseaux calcifiés ; ces corps apoptotiques permettraient la concentration du calcium et du phosphate à la manière des vésicules matricielles (Proudfoot et al., 2000).

De nombreux facteurs interviennent dans la régulation complexe de la calcification vasculaire (figure 5). Parmi ces facteurs, le développement de la calcification vasculaire repose essentiellement sur le déséquilibre entre inducteurs de la calcification tels que l'hyperphosphatémie et la BMP2, et inhibiteurs de la calcification comme la fétuine A ou la Matrix Gla Protein, une protéine vitamine K dépendante. (Chen and Moe, 2015 ; Sage et al., 2010 ; Schlieper et al., 2016)

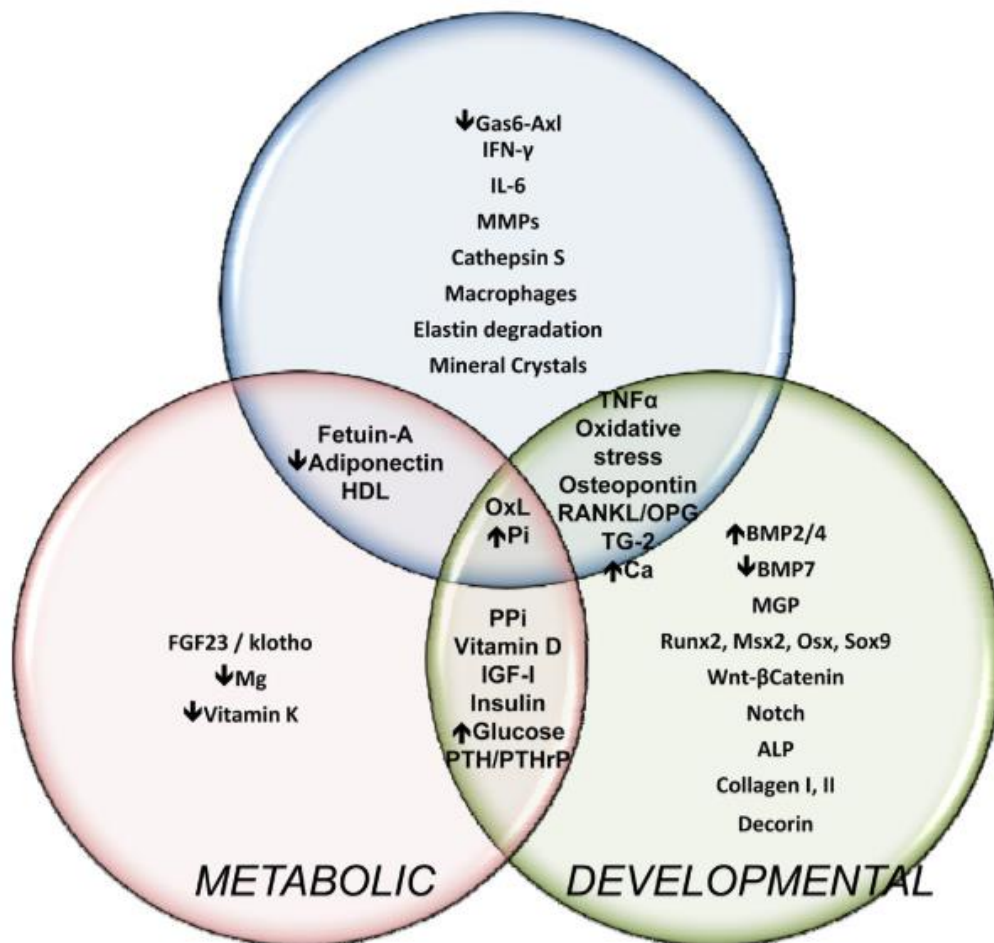


Figure 5 : Facteurs de régulation de la calcification vasculaire (Sage et al, 2010)

Le rôle d'inhibiteur de la calcification artérielle de la Matrix Gla Protein a été mis en évidence grâce à des souris déficientes en MGP, qui présentaient une calcification spontanée totale de la paroi de l'aorte et des gros vaisseaux, menant à la mort des individus par ruptures vasculaires (Luo et al., 1997). Son mode d'action passerait par plusieurs mécanismes : chélation du calcium et des cristaux d'hydroxyapatite, empêchant ainsi la croissance des cristaux ; régulation de l'apoptose, permettant la diminution de la formation des corps apoptotiques ;

inhibition de la transdifférenciation des cellules musculaires lisses vasculaires en cellules ostéochondrogéniques ; fixation et inhibition de la BMP2, un facteur de différenciation connu pour stimuler l'ossification ectopique *in vitro* et *in vivo*. (Bjorklund et al., 2018 ; Boström et al., 2001 ; Harbuzova and Ataman, 2011). Son mode d'action n'est pas encore parfaitement élucidé, mais il est montré que la MGP doit être γ -carboxylée pour remplir son rôle d'inhibiteur de la calcification vasculaire. (Price et al., 2000 ; Sweatt et al., 2003)

2. La biologie de la vitamine K

a. Apport, absorption et métabolisme de la vitamine K

Les sources potentielles de vitamine K pour l'organisme dépendent de la molécule considérée : la phylloquinone se rencontre essentiellement dans les légumes verts tels que les épinards, le chou ou encore le chou-fleur ; la ménadione est une molécule de synthèse, ajoutée à la nourriture pour animaux et transformée en ménaquinone-4 par le foie ; les ménaquinones se trouvent quant à elles dans le beurre, le jaune d'œuf ou le natto par exemple, mais sont également synthétisées par la flore bactérienne intestinale (ménaquinones à longues chaînes latérales) et par certains tissus de l'organisme (ménaquinone-4, synthétisée à partir de la phylloquinone par le pancréas et l'endothélium vasculaire grâce à la phényltransférase domain-containing protein 1 (UBIAD1), et synthétisée à partir de la ménadione par le foie). (Hirota et al., 2015, 2013 ; Okano et al., 2008 ; Walther et al., 2013)

La phylloquinone est absorbée au niveau de l'intestin grêle par un mécanisme actif employant des transporteurs ATP-dépendants ; les ménaquinones diffusent quant à elles passivement à travers la paroi colique (Shearer and Newman, 2008) ; enfin, chez le Chien, la ménadione serait absorbée passivement par l'intestin grêle et le colon. (National Research Council, Division on Earth and Life Studies, Board on Agriculture and Natural Resources, Committee on Animal Nutrition, Subcommittee on Dog and Cat Nutrition, 2006)

Certains organes présentent une relative réserve de vitamine K : les ménaquinones à longue chaîne latérale se concentrent dans le foie, la ménaquinone-4 se retrouve surtout dans les reins, le cerveau et le pancréas, et la phylloquinone est essentiellement présente dans le foie, le pancréas et le cœur (Fusaro et al., 2017a). Toutefois, c'est avant tout grâce à un apport régulier via l'alimentation et au recyclage de la vitamine K que la consommation de l'organisme est couverte. (Stafford, n.d.)

b. Consommation et recyclage de la vitamine K : le cycle de la vitamine K

Les molécules de vitamine K apportées par l'alimentation sont sous la forme quinone (« K » sur la figure 6), non fonctionnelle. La réduction de cette forme donne la forme hydroquinone (« KH₂ » sur la figure 6) active. Cette forme hydroquinone est une coenzyme des γ -glutamyl-carboxylases vitamine K-dépendantes (« GGCX »), permettant la réaction de γ -carboxylation des glutamates des protéines vitamine K-dépendantes, au cours de laquelle la forme hydroquinone est convertie en forme époxyde (« KO » sur la figure 6).

Le recyclage de cette forme époxyde est assuré par le complexe enzymatique Vitamine K-époxyde réductase (« VKOR »), dithiol-dépendant, permettant la réduction de la forme époxyde en quinone puis en hydroquinone. La forme quinone (mais non la forme époxyde) peut également être réduite au niveau hépatique par d'autres réductases, telle que la DT-diaphorase NAD(P)H-dépendante. (Stafford, n.d.)

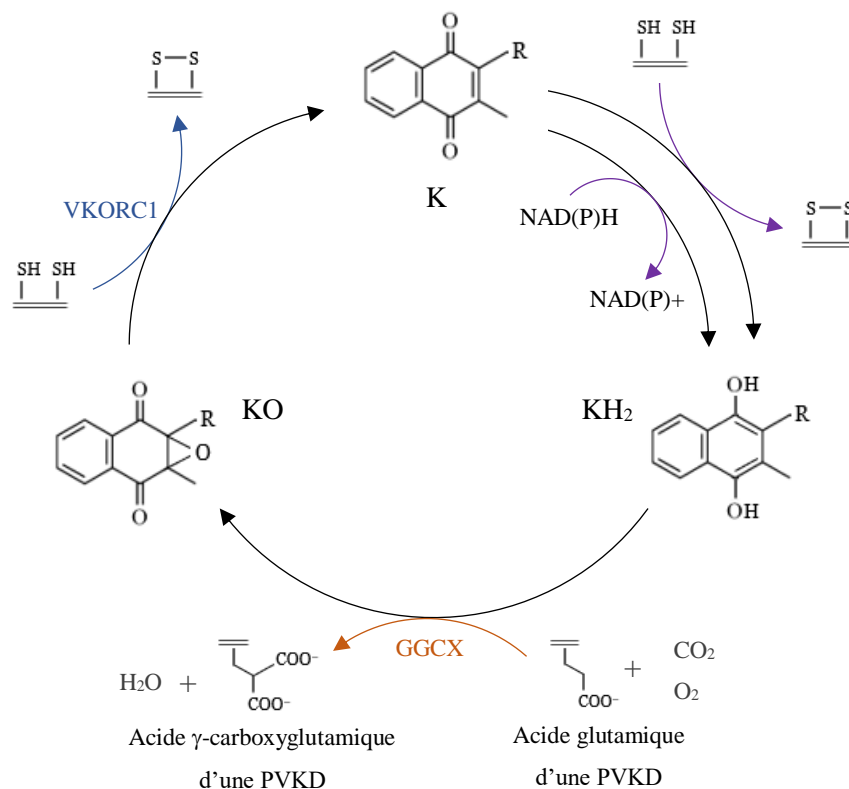


Figure 6 : Le cycle de la vitamine K (Stafford et al., 2005)
K : forme quinone ; *KH₂* : forme hydroquinone ; *KO* : forme époxyde ; *GGCX* : γ -glutamyl-carboxylase, vitamine K-dépendante ; *PVKD* : Protéine Vitamine K-dépendante (facteurs de coagulation II, VII, IX, X, MGP, BGP) ; *VKORC1* : sous-unité C1 du complexe Vitamine K-époxyde-réductase (*VKOR*).

3. La γ -carboxylation des glutamates des protéines vitamines K dépendantes

La γ -glutamyl carboxylase vitamine K dépendante est une glycoprotéine membranaire. Ses substrats, les protéines vitamine K dépendantes, présentent toutes un domaine « GLA » où sont regroupés des acides glutamiques carboxylables et, pour la plupart, un peptide situé en amont de ce domaine GLA, constitué d'une séquence homologue d'environ 18 acides aminés. Les protéines vitamine K dépendantes se fixent à la γ -glutamyl carboxylase par l'intermédiaire de ce propeptide (figure 7A).

Le propeptide reste fixé à la γ -glutamyl carboxylase pendant que le domaine « GLA » subit des changements conformationnels au fur et à mesure que les acides glutamiques sont carboxylés (figure 7B). Pendant la réaction, la γ -glutamyl carboxylase est aussi carboxylée ; à l'issue de la réaction, la vitamine K qui tient le rôle de co-enzyme se retrouve sous forme époxyde, non-fonctionnelle.

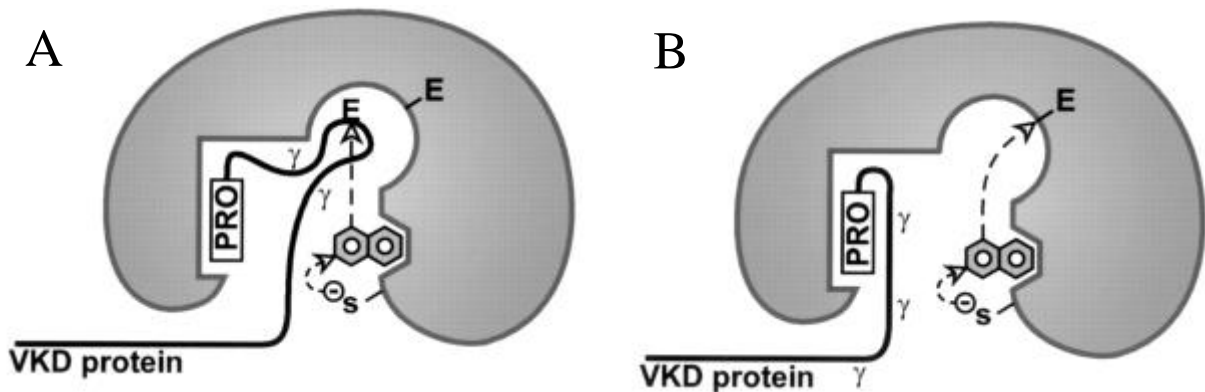


Figure 7 : Fixation à la GGCX et modifications conformationnelles des PVKD au cours de leur γ -carboxylation

Les facteurs de coagulation II, VII, IX et X, la protéine C, la Matrix Gla Protein, et la Bone Gla Protein (ostéocalcine) sont des protéines vitamine K dépendantes, activées par γ -carboxylation des acides glutamiques de leurs domaines « GLA ».

Ainsi, un déficit en vitamine K sous forme hydroquinone empêche la γ -carboxylation des glutamates des protéines vitamine K dépendantes, qui sont alors incapables de remplir leur fonction : les troubles de l'hémostase s'installent, la calcification vasculaire se met en place, et la minéralisation osseuse est altérée.

C. Principales origines des déficits en vitamine K

L'organisme ne disposant pas de stock de vitamine K, l'apparition d'un déficit en vitamine K tient de deux étiologies principales : le défaut d'apport (alimentaire) et l'absence de recyclage. Il a par ailleurs été montré que certaines maladies intercurrentes peuvent être à l'origine d'un déficit en vitamine K fonctionnelle.

1. Défaut d'apport en vitamine K : la carence alimentaire

a. Chez l'Homme

Chez l'Homme, la principale source de vitamine K dans la plupart des régimes alimentaires est la phylloquinone apportée par la consommation de légumes. L'étude des habitudes alimentaires recueillies par questionnaire aux Pays-Bas suggère que la vitamine K est apportée pour 90% par la phylloquinone, pour 7,5% par les ménaquinones 5-10 et pour 2,5% par la ménaquinone 4 (Schurgers et al., 1999). En Europe et aux Etats-Unis, plus de la moitié de la phylloquinone est apportée par la consommation de légumes (Booth and Suttie, 1998 ; Thane et al., 2006, 2002) et les sources principales de ménaquinones à longue chaîne latérale sont le foie animal et les produits fermentés tels que le fromage et le natto. (Schurgers and Vermeer, 2000)

Par ailleurs, les bactéries commensales du colon sont connues pour synthétiser des ménaquinones, offrant un réservoir de ménaquinones de 0,5 à 5 mg (Conly et al., 1994). Toutefois, ce réservoir de vitamine K est peu mobilisable par l'organisme, pour deux raisons principales : d'une part, l'intervention de sels biliaires est essentielle à l'absorption entérale de la vitamine K, et ceux-ci ne sont pas présents au niveau du colon ; d'autre part, la grande majorité des ménaquinones coliques sont liées aux membranes bactériennes, et très peu sont libérées et donc absorbables par le système digestif. (Shearer, 2009)

Ainsi, l'apport de vitamine K tient essentiellement du régime alimentaire suivi : l'apport journalier recommandé en phylloquinone pour un adulte en bonne santé est de 120 µg pour l'homme et 90 µg pour la femme (tableau I). (Shearer, 2009)

Tableau I : Apport quotidien adéquat en phylloquinone chez l'Homme en fonction de l'âge (Shearer et al, 2009)

Âge	Apport adéquat (µg/jour)
0 à 6 mois	2,0
7 à 12 mois	2,5
1 à 3 ans	30
4 à 8 ans	55
9 à 13 ans	60
14 à 18 ans	75
Hommes ≥ 19 ans	120
Femmes ≥ 19 ans	90

b. Chez le Chien

La carence alimentaire en vitamine K chez le Chien est anecdotique : en effet, les bactéries constituant la flore intestinale canine synthétisent des ménaquinones à longue chaîne latérale, parfaitement absorbées et utilisées par l'organisme. Etant donné que toute altération de l'intégrité de la flore intestinale, par exemple en cas de traitement antibiotique, pourrait conduire à un déficit en vitamine K par défaut de synthèse bactérienne, le National Research Council a toutefois établi des recommandations (tableau II) d'apport en vitamine K chez le Chien. (National Research Council, Division on Earth and Life Studies, Board on Agriculture and Natural Resources, Committee on Animal Nutrition, Subcommittee on Dog and Cat Nutrition, 2001 ; Sanderson, n.d.)

Tableau II : Apport recommandé en vitamine K chez le Chien (National Research Council, 2001)

Âge	Apport adéquat (µg/1000 kcal EM)
Chiot	330
Chien adulte	450

2. Administration d'antagonistes de la vitamine K

a. Utilisations des antagonistes de la vitamine K

La découverte des antagonistes de la vitamine K a eu lieu au cours des années 1920, aux Etats-Unis, quand des troubles hémorragiques apparaissent au sein d'un troupeau de bétail après avoir consommé du mélilot fermenté. Karl Link parvient, en 1939, à identifier et isoler l'agent responsable de ces troubles de la coagulation : le dicoumarol (dimère de la 4-hydroxycoumarine). Plus tard, en 1949, Karl Link développe une nouvelle molécule anti-coagulante à des fins rodenticides : le coumafène (warfarine). Aujourd'hui, les antagonistes de la vitamine K (AVK) comprennent deux générations de molécules, l'apparition de résistances au coumafène chez le Rat ayant mené au cours des années 1960 au développement de nouvelles molécules.

Mais les antagonistes de la vitamine K ne se cantonnent pas à un usage raticide et sont employés en médecine humaine dès les années 1940 pour le dicoumarol et les années 1950 pour le coumafène (tableau III) (Mueller and Scheidt, 1994). Ils sont ainsi indiqués dans la prévention de troubles thrombo-emboliques chez les patients à risque : après la pose d'une prothèse valvulaire cardiaque, en cas de fibrillation atriale ou encore d'obturation d'artères coronaires. Leur usage thérapeutique fait toutefois l'objet d'un suivi strict par la mesure régulière de l'International Normalized Ratio (INR) afin de vérifier l'absence de toxicité du traitement. L'INR est le rapport entre le temps de prothrombine mesuré du patient et la valeur moyenne normale du temps de prothrombine : il doit être compris entre 2 et 4, selon l'affection traitée. (Ansell et al., 2008 ; Witzenbichler, 2011)

Tableau III : Utilisations des antagonistes de la vitamine K en médecine humaine et en tant que raticide anti-coagulant

AVK utilisés comme raticide anti-coagulant		AVK utilisés en médecine humaine
1 ^{ère} génération	Warfarine Diphacinone	Warfarine (Coumadine ND)
2 ^{ème} génération	Bromadiolone Difénacoum Brodifacoum Diféthialone Flocoumafène	Acénocoumarol (Sintrom ND, Minisintrim ND) Fluindione (Previscan ND)

Contrairement à la médecine humaine, les antagonistes de la vitamine K ne sont pas utilisés à but thérapeutique ou préventif en médecine vétérinaire : l'ingestion d'AVK par les animaux domestiques relève essentiellement de l'intoxication, accidentelle ou volontaire, aux raticides anti-coagulants. Ainsi, entre 2009 et 2014, 11 083 appels au Centre National d'Informations Toxicologiques Vétérinaires faisaient l'objet d'une suspicion d'intoxication aux AVK, soit 11,54% des appels reçus sur cette période. (Mallet, 2017)

b. Pharmacocinétique des antagonistes de la vitamine K

Chez l'Homme, l'absorption par voie orale de la warfarine est intestinale et très rapide : la concentration sanguine maximale est atteinte 90 minutes après l'administration. Chez le Chien, l'absorption des antagonistes de la vitamine K est passive et a surtout lieu au niveau du duodénum ; elle est maximale en 6 heures et totale en 24 heures. (Ansell et al., 2008 ; Roche, 2008)

Dans la circulation sanguine, les antagonistes de la vitamine K se trouvent majoritairement liés aux protéines plasmatiques, de l'ordre de 70 à 99% selon le composé considéré. L'administration conjointe de médicaments se liant également aux protéines plasmatiques (sulfamides, triméthoprime, métronidazole, néomycine, anti-inflammatoires non stéroïdiens) potentialise l'activité des antagonistes de la vitamine K par augmentation de la fraction libre et peut accentuer leur toxicité. (Roche, 2008)

Les AVK s'accumulent au niveau du foie, où ils sont métabolisés par les cytochromes P450 et subissent une glucoronoconjugaison (Ansell et al., 2008). L'élimination est d'abord biliaire, mais il existe un fort cycle entéro-hépatique ; l'élimination terminale est fécale.

Le temps de demi-vie plasmatique des AVK est variable : chez l'Homme, il est de 29 heures pour la warfarine et de 24 jours pour le brodifacoum (Ansell et al., 2008) ; chez le Chien, il est de 91 jours pour le brodifacoum. De plus, il existe une persistance hépatique augmentant avec les générations de molécules, qui est à l'origine d'une activité prolongée : la durée de persistance hépatique chez le Chien est de 7 à 15 jours pour les composés de 1^{ère} génération, 15 à 21 jours pour ceux de 2^{ème} génération, et à plus de 3 semaines pour le flocoumafène, le brodifacoum et la diféthialone. (Roche, 2008)

c. Mode d'action des antagonistes de la vitamine K

Les AVK ont une analogie structurale avec le noyau naphthoquinone de la vitamine K, leur permettant d'intervenir dans le cycle de la vitamine K en plusieurs points : ils inhibent la vitamine K époxyde réductase de façon forte (étape (1) sur la figure 8), et inhibent les enzymes permettant la réduction de la forme quinone de manière moins importante. (Ansell et al., 2008)

Après avoir permis l'activation des protéines vitamine K dépendantes grâce à la γ -glutamyl carboxylase, la vitamine K se trouve sous forme époxyde. Normalement réduite en forme quinone puis hydroquinone par la vitamine K époxyde réductase, ces étapes sont inhibées en présence d'AVK (étape (2) sur la figure 8). La vitamine K reste alors sous la forme époxyde et n'est donc pas recyclée : la γ -carboxylation des protéines vitamine K dépendantes devient impossible (étape (3) sur la figure 8). (Ansell et al., 2008)

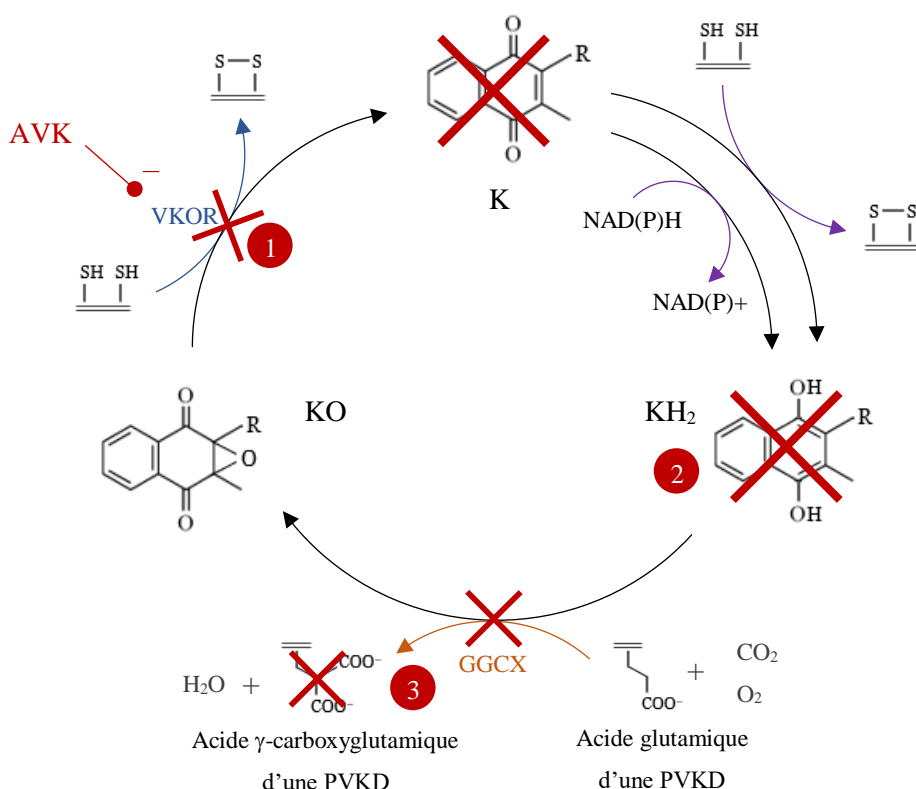


Figure 8 : Mode d'action des antagonistes de la vitamine K (Ansell et al., 2008)
Inhibition de la vitamine K époxyde réductase (1), entraînant une absence de recyclage de la vitamine K sous forme quinone puis hydroquinone (2), menant à un défaut de γ -carboxylation des acides glutamiques des protéines vitamine K dépendantes (3)

3. Le cas particulier de l'insuffisance rénale chronique

a. Mise en évidence de calcifications vasculaires et d'un déficit en vitamine K fonctionnelle en cas d'IRC

Chez l'Homme, c'est en 1979 que Ibels et al ont pour la première fois mis en évidence une augmentation de la calcification artérielle chez les patients sous dialyse par rapport à une population saine d'âge comparable (Ibels et al., 1979). Plus récemment, une étude de Moe et Chen établit que les patients atteints d'IRC sous dialyse présentent une calcification coronaire 2 à 5 fois plus étendue que les patients d'âge comparable présentant une affection avérée des artères coronaires (Moe and Chen, 2004). Par ailleurs, une étude de Goodman et al menée sur 39 patients en stade terminal d'insuffisance rénale et âgés de moins de 30 ans met en évidence que plus de 80% des patients de 20 à 30 ans présentent une calcification des artères coronaires, contre 5% au sein du groupe témoin. (Goodman et al., 2000)

L'apparition de troubles assimilables à un déficit en vitamine K est également observable chez le Rat : 4 semaines d'urémie mènent chez cette espèce à une diminution de l'activité de l'enzyme γ -glutamyl-carboxylase ainsi qu'à une augmentation du contenu vasculaire aortique et rénal en calcium, sans signe de calcification vasculaire, et 7 semaines d'urémie engendrent une calcification vasculaire anormale de l'aorte, du cœur et des reins. Or, l'administration de vitamine K permet de rétablir l'activité γ -carboxylase dans le rein et de la surstimuler dans le foie, et permet de réduire la calcification vasculaire du cœur et des reins. (Kaesler et al., 2014)

b. Mécanismes menant à une diminution de la vitamine K fonctionnelle en cas d'insuffisance rénale chronique

i. Modification du métabolisme de la vitamine K

Les études suggèrent que la maladie rénale chronique modifie le métabolisme de la vitamine K, même à un stade modéré d'avancement de la maladie. En effet, les rats atteints de maladie rénale chronique présentent une diminution de l'expression de plusieurs enzymes intervenant dans le métabolisme de la vitamine K : la vitamine K époxyde réductase (enzyme de recyclage de la vitamine K), la γ -glutamyl-carboxylase (enzyme assurant la γ -carboxylation des protéines vitamine K dépendantes), et l'UBIAD1 (enzyme permettant la conversion de phylloquinone en ménaquinone-4).

De cette altération du métabolisme de la vitamine K résulte une diminution de la concentration en vitamine K fonctionnelle dans les tissus (McCabe et al., 2017), et ainsi une altération de la γ -carboxylation des protéines vitamine K dépendantes, parmi lesquelles la MGP, inapte à exercer son rôle d'inhibiteur de la calcification vasculaire.

ii. Diminution des apports alimentaires chez l'Homme

En plus de la diminution de l'expression des enzymes du métabolisme de la vitamine K, les déficits en vitamine K fonctionnelle lors de maladie rénale chronique tiennent d'une seconde origine potentielle chez l'Homme : la baisse des apports alimentaires. En effet, les patients se doivent de suivre un régime alimentaire adapté à la maladie rénale chronique, aux apports moindres comparés aux individus sains : plus faible apport en énergie, protéines, graisses, carbohydrates, fibres, minéraux (Ca, P, Fe, Na, K, Zn, Cu, Mg), ainsi qu'en vitamines A, B1, B2, C, D, E, folates, K1 and PP. De fait, 70 à 90% des patients atteints d'IRC ont un apport en vitamine K₁ insuffisant, avec un apport journalier moyen de 72 μ g, contre 129 μ g chez les individus témoin, pour un apport journalier recommandé de 90 μ g pour les femmes et 120 μ g pour les hommes. (Fusaro et al., 2017b ; Shearer, 2009)

iii. Le cas particulier des patients sous traitement AVK

Chez l'Homme, les patients atteints d'insuffisance rénale chronique présentent une plus grande prévalence de l'ensemble des maladies cardiovasculaires (figure 9), et 55% des décès chez les patients en stade terminal d'IRC tient d'une origine cardiovasculaire (figure 10). (Saran et al., 2018)

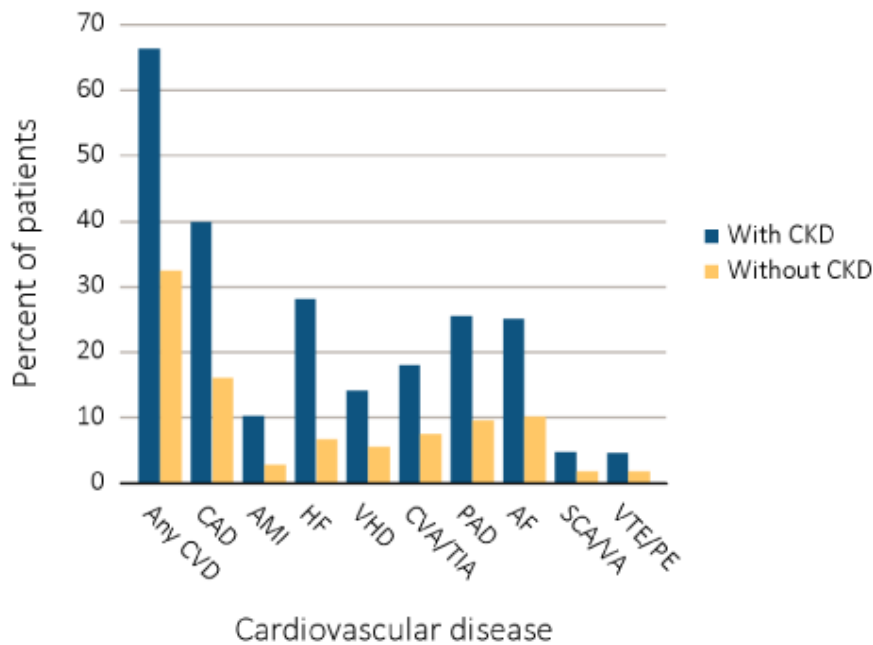


Figure 9 : Maladies cardiovasculaires chez les patients avec et sans IRC (Saran et al, 2018)
 CKD = Insuffisance rénale chronique ; CVD = Maladie cardiovasculaire ; CAD = Maladie coronarienne ; AMI = Infarctus aigu du myocarde ; HF = Insuffisance cardiaque ; VHD = Maladie valvulaire cardiaque ; CVA/TIA = Accident vasculaire cérébral et Accident ischémique transitoire ; PAD = Maladie artérielle périphérique ; AF = Fibrillation atriale ; SCA/VA = Arrêt cardiaque et arythmies ventriculaires ; VTE/PE = Thrombo-embolisme veineux et embolisme pulmonaire

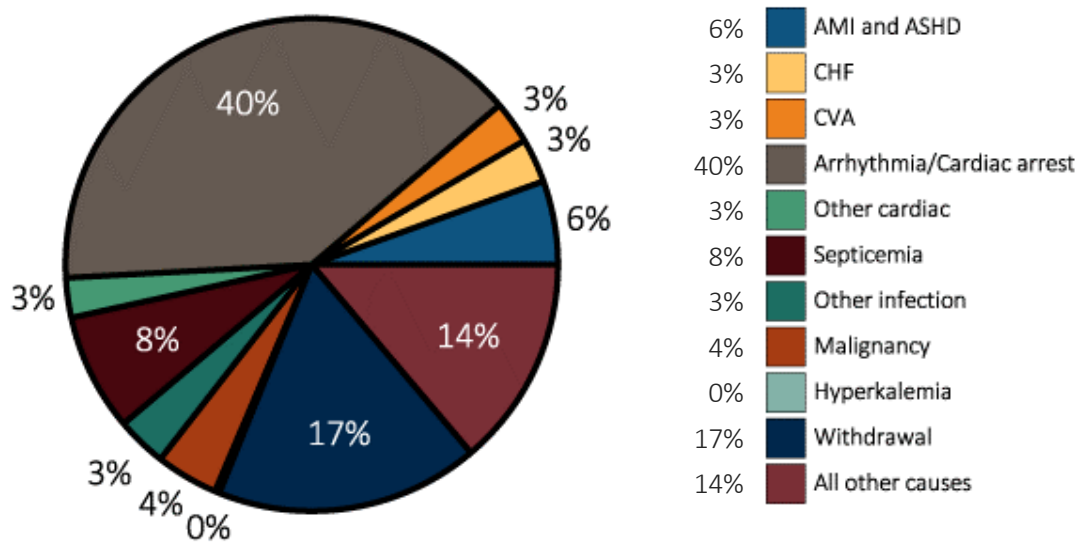


Figure 10 : Causes de décès chez les patients en stade terminal d'IRC (Saran et al, 2018)
 AMI = Infarctus aigu du myocarde ; CHF = Insuffisance cardiaque congestive ; CVA = Accident vasculaire cérébral

Ainsi, les situations pour lesquelles l'usage d'antagonistes de la vitamine K pourrait être indiqué sont d'autant plus nombreuses chez les patients atteints d'IRC, chez qui les troubles thrombo-emboliques, les maladies valvulaires cardiaques, la fibrillation atriale et les maladies coronariennes sont 2 à 3 fois plus fréquents.

Mais l'administration de warfarine aux patients insuffisants rénaux, en augmentant le déficit en vitamine K et ainsi diminuant l'activation des protéines vitamine K dépendantes, potentialise chez l'Homme la calcification vasculaire (Nayak-Rao and Shenoy, 2017) d'une part et l'apparition de saignements (Reinecke et al., 2009) d'autre part, augmentant le risque d'occurrence d'accident vasculaire cérébral (Chan et al., 2009). Également, chez un modèle murin d'insuffisance rénale chronique avancée, l'administration de warfarine contribue à accélérer la calcification vasculaire. (Tsai et al., 2018)

iv. Existence de mécanismes surajoutés au déficit en vitamine K

Les mécanismes menant à l'augmentation de la calcification artérielle en cas d'IRC ne se limitent pas au seul déficit en vitamine K fonctionnelle.

L'un des éléments participant au développement de la calcification vasculaire chez les patients atteints d'IRC est le dérèglement du métabolisme phospho-calcique, et l'augmentation des concentrations en phosphate qui en résulte. En effet, les patients sujets à calcification artérielle présentent une concentration sérique en phosphate et un produit calcium x phosphate sériques plus élevés que ceux ne présentant pas de calcification artérielle (Goodman et al., 2000), et il est montré qu'une concentration en phosphate supérieure à 1,4 mmol/L (comparable aux concentrations sériques en phosphate rencontrées chez les patients en stade terminal d'insuffisance rénale chronique) stimule la minéralisation par les cellules musculaires lisses vasculaires humaines *in vitro*. (Jono et al., 2000)

Parmi les autres facteurs qui se sont révélés concourir à la calcification artérielle de l'IRC, nous pouvons également citer l'augmentation de l'expression et de la synthèse de BMP2 au niveau des vaisseaux calcifiés (Disthabanchong, 2012) ; l'implication de cette protéine est d'autant plus éloquentes étant donnée l'altération de la γ -carboxylation de la MGP en cas d'IRC, qui est alors incapable d'exercer son action inhibitrice sur la BMP2.

c. Conséquences cliniques de ces troubles

La première complication causée par la calcification vasculaire décrite chez les patients en stade terminale d'insuffisance rénale chronique est la calcification artériolaire urémique (calciphylaxis) : une phase de *livedo reticularis* suivie d'une nécrose et d'une ulcération cutanée. Cette complication est associée à un haut taux de mortalité (sepsis, arrêt cardiaque, hémorragie gastro-intestinale) et de morbidité, mais qui reste très rare avec 16 cas rencontrés par Coates et al entre 1985 et 1996. (Coates et al., 1998)

Toutefois, l'implication de la calcification artérielle dans l'occurrence de complications chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique ne se limite pas à la calciphylaxis. En effet, la calcification artérielle est démontrée comme étant à l'origine d'une augmentation de la rigidité de la paroi artérielle, d'une hypertrophie ventriculaire gauche, d'une diminution de la perfusion coronaire, d'une ischémie myocardique et finalement d'une augmentation de la morbidité et de la mortalité cardiovasculaires. (Ogawa and Nitta, 2018 ; Rennenberg et al., 2009)

Plus particulièrement chez les patients en stade terminal d'insuffisance rénale chronique, le score de calcification de l'aorte abdominale s'avère être un bon prédicteur de la survenue de complications cardiovasculaires mortelles ou non (Verbeke et al., 2011), et la calcification de la média artérielle est un indicateur pronostic fort de la mortalité d'origine cardiovasculaire et de la mortalité totale (London et al., 2003). Finalement, une méta-analyse de 30 études prospectives concernant la calcification vasculaire et la survenue de problèmes cardiovasculaires décrit que la calcification artérielle est associée à un risque 6,22 fois plus élevé de développer un problème cardiovasculaire chez les patients en stade terminal d'IRC, contre un risque 3,41 fois plus élevé chez la population totale. (Rennenberg et al., 2009)

II. La Matrix Gla Protein : une protéine γ -carboxylable vitamine K dépendante qui inhibe la calcification artérielle

A. Caractérisation de la protéine

1. Structures et modifications post-traductionnelles de la MGP

La protéine MGP mature est une petite protéine de 84 acides aminés, pour environ 14kDa, à la fois chez l'Homme et le Chien. Les MGP humaine et canine sont homologues à 89,29% (fig 10).

Homme :

YESHESMESY ELNPFINRRN ANTFISPQQR WRAKVQERIR ERSKPVHELN
REACDDYRLC ERYAMVYGYN AAYNRYFRKR RGTK

Chien

YESHESMESY EINPFINRRN ANTFISPQQR WRAKAQERIR ETTKPAYELN
REACDDFKLC ERYAMVYGYN AAYNRYFRHR RGGK

*Figure 11 : Structure primaire des protéines MGP humaine et canine
Les acides aminés qui diffèrent entre les deux protéines sont soulignés*

Les MGP humaine et canine sont respectivement constituées de 57% et de 54% d'acides aminés polaires, dont environ 64% sont chargés (tableau IV), pour un point iso-électronique égal à 9,7 (Schurgers et al., 2008). Ainsi, du fait de sa polarité et de sa charge, la MGP est une protéine hydrosoluble au pH sanguin.

Tableau IV : Polarité et charge des acides aminés constituant les protéines MGP humaine et canine

Acides aminés		MGP humaine	MGP canine
Polaires non chargés		17 (20,24%)	17 (20,24%)
Polaires chargés	Positifs	20 (23,81%)	18 (21,42%)
	Négatifs	11 (13,10%)	11 (13,10%)
Non polaires		36 (42,85%)	38 (45,24%)

La MGP peut subir 2 modifications post-traductionnelles : sur les 9 résidus glutamates qu'elle possède, 5 peuvent être γ -carboxylés grâce à la vitamine K, et parmi ses 5 sérines, 3 peuvent être phosphorylées (figure 12). (Schurgers et al., 2008)

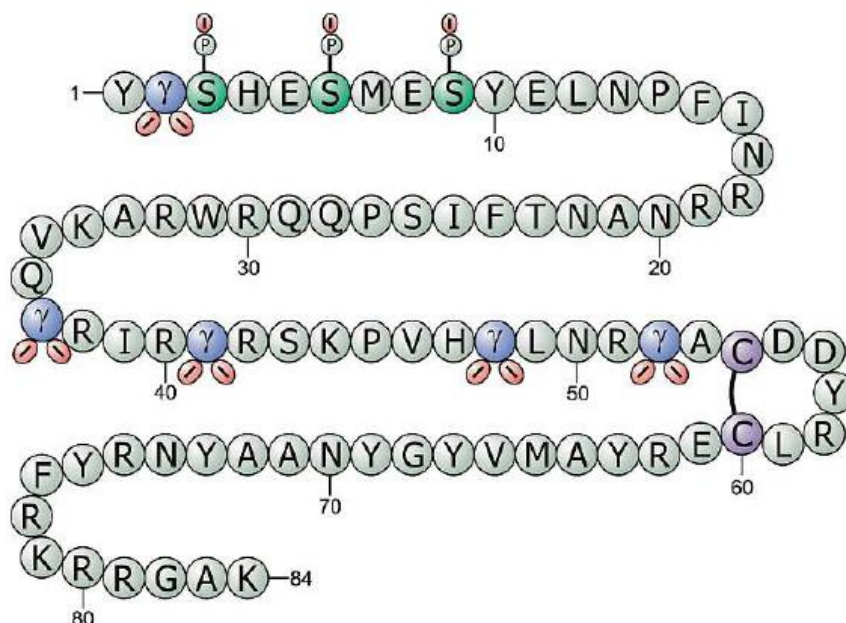


Figure 12 : Sites de modifications post-traductionnelles de la MGP humaine (Schurgers et al, 2008)

Comme pour l'ensemble des protéines vitamine K dépendantes, la γ -carboxylation des acides glutamiques est nécessaire à l'activité de la MGP (Price et al., 2000 ; Sweatt et al., 2003), et est assurée par la γ -glutamyl carboxylase vitamine K dépendante ; toutefois, contrairement à la plupart des protéines vitamine K dépendantes pour lesquelles le propeptide permettant la fixation à cette enzyme est situé juste en position et est clivé durant la maturation protéique, la MGP se lie à la GGCX par un peptide compris à part entière dans la protéine mature. (Schurgers et al., 2008 ; Wajih et al., 2004)

Price et al ont montré que la phosphorylation des sérines de la MGP est assurée par la Golgi casein kinase, et permise par la reconnaissance de la répétition du motif « Ser – X – Glu », conservée chez l'Homme, le Rat, la Vache, le Mouton et le Requin. (Price et al., 1994)

2. Expression, synthèse et excrétion de la MGP

Les ARNm MGP ont été détectés par Northern blot dans tous les tissus de vertébrés, avec des niveaux maximaux dans le cœur, les poumons, les rein et le cartilage (Fraser and Price, 1988). Toutefois, le modèle des souris déficientes en MGP a permis de mieux comprendre l'expression de cette protéine. D'une part, le rétablissement de l'expression de la MGP par les seules cellules musculaires lisses vasculaires permet de restaurer un phénotype sain à ces souris ; d'autre part, le rétablissement de l'expression de la MGP par le foie engendre de hauts

niveaux de MGP circulante, mais n'a aucune action inhibitrice sur la calcification vasculaire. Ainsi, il apparaît que l'inhibition de la calcification vasculaire par la MGP est le fruit d'une activité locale, au niveau de son site de synthèse et d'excrétion par les cellules musculaires lisses vasculaires. (Murshed et al., 2004)

S'il est établi que la γ -carboxylation des acides glutamiques est indispensable à l'activité de la protéine, la phosphorylation des sérines tient quant à elle un rôle moins clairement défini, mais vraisemblablement essentiel à la bonne excrétion de la MGP : en effet, *in vitro*, alors que la MGP phosphorylée suit la voie de l'excrétion au sein des cellules musculaires lisses vasculaires, la MGP non phosphorylée est cantonnée au cytosol de ces cellules, et n'est donc vraisemblablement pas excrétée par les cellules musculaires lisses vasculaires. (Wajih et al., 2004)

Aux concentrations physiologiques, la vitamine D3 stimule l'expression de la MGP au sein des cellules musculaires lisses vasculaires et l'acide rétinique, un régulateur de la maturation et de la minéralisation chondrocytaires, inhibe l'expression de la MGP au sein de ces cellules musculaires lisses vasculaires. (Price et al., 1994)

B. Implications physiopathologiques de la MGP

1. Etat de γ -carboxylation de la MGP et calcification vasculaire

a. Calcification vasculaire et état de γ -carboxylation de la MGP au sein de la paroi vasculaire

Chez le Rat, l'immunohistochimie menée avec des anticorps conformation-spécifiques permet de mettre en évidence que la MGP présente dans la paroi aortique calcifiée d'individus âgés est majoritairement non γ -carboxylée (Schurgers et al., 2005 ; Sweatt et al., 2003). Par ailleurs, chez le Rat après induction de calcifications artérielles par administration de vitamine D et de warfarine, il apparaît que la MGP accumulée au niveau des sites de calcification est également sous la forme non γ -carboxylée. (Price et al., 2000 ; Schurgers et al., 2005)

b. Calcification vasculaire et état de γ -carboxylation de la MGP dans le plasma

Ces études soulignent l'association entre calcification vasculaire et défaut de γ -carboxylation de la MGP au niveau de la paroi vasculaire, mais l'étude de l'état de γ -carboxylation de la MGP peut être étendu à son dosage dans le plasma, offrant un paramètre d'accès plus pratique pour l'exploration de la calcification artérielle.

En effet, chez l'Homme, le dosage de la concentration plasmatique en MGP non γ -carboxylée chez des individus possédant au moins un facteur de risque de calcification des artères coronaires révèle une corrélation négative significative entre la calcification de ces artères et concentration plasmatique ucMGP (Torii et al., 2016). Également, chez les patients atteints d'IRC, les études soulignent une corrélation positive significative entre la sévérité de la calcification artérielle et la concentration plasmatique en dpucMGP (figure 13). (Aoun et al., 2017 ; Puzantian et al., 2018 ; Schurgers et al., 2010 ; Thamratnookon et al., 2017)

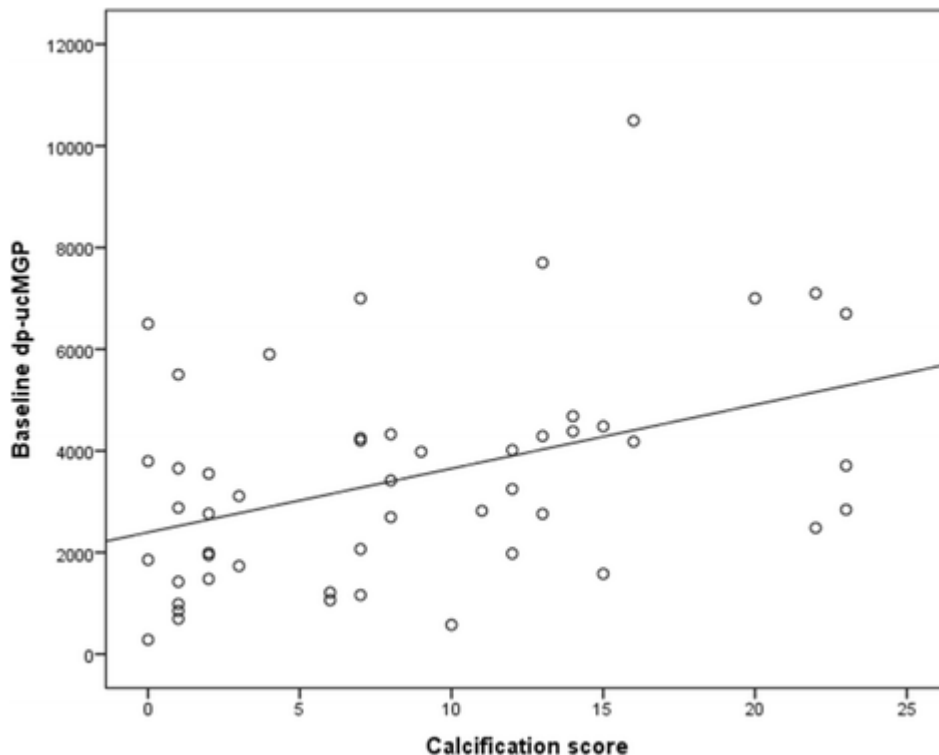


Figure 13 : Relation entre la concentration en dpucMGP plasmatique et le score de calcification chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (Aoun et al, 2017)
Coefficient de corrélation de Spearman = 0.43 ; $p = 0.002$

2. Relation entre dpucMGP plasmatique et stade d'IRC

L'intérêt de l'analyse quantitative de la dpucMGP plasmatique ne se limite pas à la seule évaluation de la calcification artérielle : en effet, chez l'Homme, plusieurs études montrent une corrélation directe entre la concentration plasmatique en dpucMGP et le stade d'IRC du patient. (Kurnatowska et al., 2016 ; Schurgers et al., 2010)

L'étude de Schurgers et al, menée sur 107 patients atteints d'IRC de stades 2 à 5 met en évidence une augmentation de la concentration plasmatique en dpucMGP avec le stade d'IRC, avec une augmentation significative de la concentration plasmatique en dpucMGP à partir du stade 4 par rapport à un échantillon de 77 individus sains (figure14). (Schurgers et al., 2010)

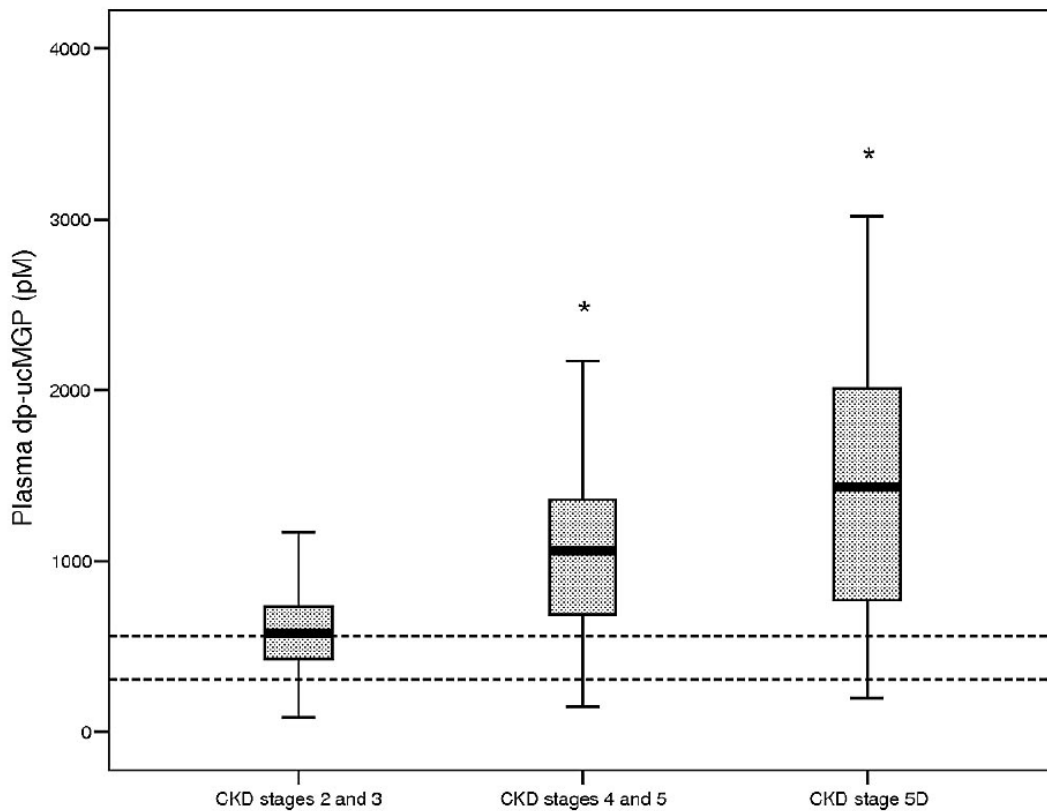


Figure 14 : Concentration plasmatique en dpucMGP en fonction du stade d'IRC (Schurgers et al, 2010)

* : $p < 0,001$; les lignes en pointillés représentent les limites supérieure et inférieure de la concentration en dpucMGP plasmatique chez le groupe contrôle.

L'étude de Kurnatowska, menée sur 38 patients atteints d'IRC de stade 4 ou 5, révèle quant à elle une augmentation significative de la concentration en dpucMGP plasmatique chez les patients au stade 5 par rapport au stade 4 (tableau V). (Kurnatowska et al., 2016)

Tableau V : Concentration en dpucMGP plasmatique en fonction du stade d'IRC chez l'Homme (Kurnatowska et al., 2016)

Stade de la MRC	dpucMGP plasmatique (pmol/L)	p-value
4	885,1 ± 419,7	p = 0,04
5	1388,3 ± 505,4	

3. Relation entre dpucMGP plasmatique et fonction rénale

De plus, la dpucMGP plasmatique apparaît comme un marqueur intéressant pour l'évaluation de la fonction rénale : il existe une forte corrélation négative entre la concentration en dpucMGP plasmatique et le débit de filtration glomérulaire (DFG) estimé (figure 15) (Kurnatowska et al., 2016 ; Puzantian et al., 2018 ; Schurgers et al., 2010), ainsi qu'une forte corrélation positive entre la concentration en dpucMGP plasmatique et la créatininémie. (Kurnatowska et al., 2016)

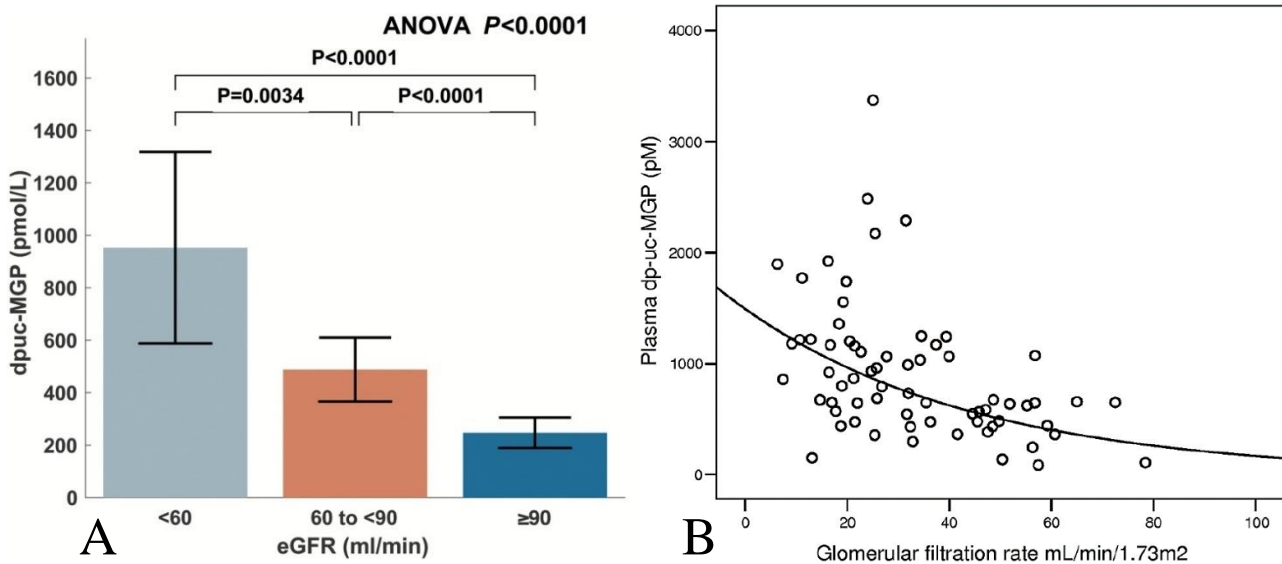


Figure 15 : Relation entre concentration en dpucMGP plasmatique et DFG (Puzantian et al., 2018 ; Schurgers et al., 2010)

A : Puzantian et al., 2018

B : Schurgers et al., 2010 ; $r^2 = 0,268$, $p < 0,0001$

4. La dpucMGP plasmatique en indicateur de complications ?

Durant l'étude menée par Schurgers et al, 34 des patients suivis sont décédés. Schurgers s'est alors intéressé à la concentration en dpucMGP plasmatique de ces patients : une première analyse met en évidence qu'une concentration plasmatique en dpucMGP supérieure à 921 pmol/L est un facteur pronostic négatif, indice fort d'un risque de mortalité globale. Toutefois, une analyse plus poussée (en éliminant les biais liés à l'âge, au taux d'hémoglobine sanguine, ou au stade d'IRC) amène l'auteur à remettre en question cette relation entre concentration plasmatique en dpucMGP et mortalité globale. (Schurgers et al., 2010)

Cependant, étant donné que la prédisposition des patients atteints d'IRC à présenter un déficit en vitamine K fonctionnelle, disposer d'un outil permettant d'estimer la fonctionnalité de la vitamine K pourrait s'avérer incontournable dans la prévention et le suivi des complications vitamine K dépendantes chez les patients atteints d'IRC. (Fusaro et al., 2017b)

Plusieurs études mettent en évidence que supplémenter en vitamine K à des doses pharmaceutiques les patients atteints d'IRC permet de diminuer la concentration en dpucMGP plasmatique (Aoun et al., 2017 ; Caluwé et al., 2014 ; Kurnatowska et al., 2016). Kurnatowska et al observent que 70,2% les patients recevant de la vitamine K2 à la dose de 90µg/jour associée à de la vitamine D à la dose de 10µg/jour présentent une diminution de la concentration en dpucMGP plasmatique de 10,7% après 270 jours de traitement (Kurnatowska et al., 2016). Caluwé et al mettent en évidence qu'au moins 71% des patients recevant de la ménaquinone-7 présentent une diminution de la concentration en dpucMGP d'au moins 10% après 8 semaines de traitement : le taux de réponse et la diminution de la concentration plasmatique en dpucMGP sont proportionnels à la dose de ménaquinone-7 administrée (tableau VI) (Caluwé et al., 2014). Enfin, dans l'étude menée par Aoun et al, la supplémentation des patients en ménaquinone-7 à la dose de 360µg SID pendant le repas permet de diminuer la concentration en dpucMGP plasmatique moyenne de 3719 pmol/L à 294, pmol/L après 4 semaines de traitement. (Aoun et al., 2017)

Tableau VI : Supplémentation en vitamine K et diminution de la dpucMGP plasmatique chez des patients atteints d'IRC (Caluwé et al, 2014)

La valeur de dpucMGP plasmatique inscrite est la valeur moyenne du groupe traité ; le taux de réponse est défini comme le pourcentage de patients présentant un taux de diminution relative supérieur à 10%.

* : p-value < 0,001

		Dose de ménaquinone-7 administrée		
		360 µg 3x/sem	720 µg 3x/sem	1080 µg 3x/sem
dpucMGP plasmatique (pmol/L)	Initial	2872	2897	3206
	Après traitement	2306	1935	1719
Taux de diminution relative		17%*	33%*	46%*
Taux de réponse		71%	88%	96%

La variation dans l'intensité de la réponse à la supplémentation en vitamine K2 entre ces différentes études n'est pas clairement comprise. D'une part, Aoun et al ont préféré administrer la vitamine K2 au moment du repas, ce qui pourrait améliorer l'absorption de la vitamine K2 liposoluble, et donc expliquer la meilleure réponse à la supplémentation ; d'autre part, alors qu'Aoun et al ont choisi d'utiliser de la vitamine K sous forme de gélules, bien tolérées, Caluwé et al ont choisi d'administrer la vitamine K sous forme de comprimés, dont l'odeur forte a mené à quelques abandons de l'expérimentation. (Aoun et al., 2017 ; Caluwé et al., 2014)

Si ces études soulignent l'intérêt de la supplémentation en vitamine K par l'exploration de facteurs paracliniques tels que le dosage de la dpucMGP plasmatique, l'intérêt clinique de la supplémentation en vitamine K des patients atteints d'IRC n'est pas encore avéré : plusieurs études cliniques sont en cours à ce sujet et devraient apporter davantage d'informations sur l'intérêt de la supplémentation et du suivi de la concentration en dpucMGP plasmatique chez l'Homme (Fusaro et al., 2017b) ; pour l'heure, une étude menée sur un modèle murin d'insuffisance rénale chronique avancée révèle que la forte supplémentation alimentaire en ménaquinone-7 à raison de 100 µg/g d'aliment sur 12 semaines permet de diminuer la phosphatémie et d'inhiber la calcification vasculaire chez les souris IRC supplémentées par rapport aux souris IRC non supplémentées. (Scheiber et al., 2015)

**PARTIE II – Travail personnel : Synthèse
et purification d'une protéine dpucMGP
canine recombinante**

I. Matériel et méthode

A. Vérification de la séquence codante du gène MGP par séquençage

La séquence du gène MGP de l'espèce canine (ou dMGP) a été prédite par la méthode Gnomon et est accessible sur la base de données NCBI (référence NCBI : XM_003639976.4, geneID : 100856382). Le gène dMGP est composé de 3373 nucléotides et comporte 4 exons, pour une séquence codante de 309 nucléotides (figure 16).

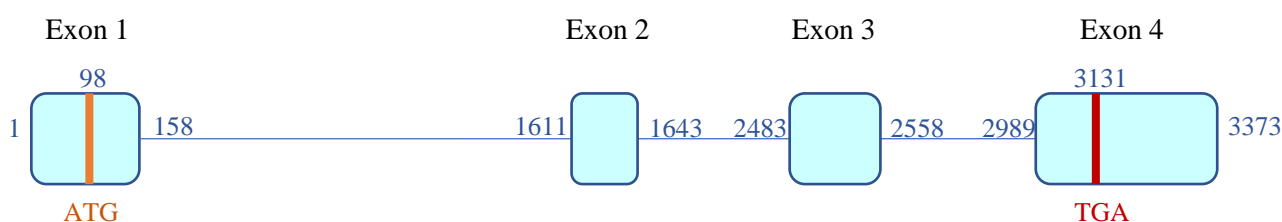


Figure 16 : Structure du gène MGP du chien

Les rectangles représentent les exons, les lignes représentent les introns

Les nombres indiquent les positions de début et de fin d'exon, et les positions des codons START et STOP

Nous avons tenu à confirmer par séquençage la séquence codante prédite, afin de s'assurer d'obtenir une protéine correspondant bien à la Matrix Gla Protein. Quatre chiens hospitalisés au Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire Vetagro-Sup Lyon devaient alors recevoir une analyse sanguine dans le cadre de leur prise en charge : nous avons utilisé ces échantillons de sang comme substrat en vue du séquençage.

Une extraction de l'ADN génomique a été réalisée sur ces échantillons de sang grâce au kit « DNEasy Blood and Tissue » de Qiagen.

La séquence codante a été amplifiée par PCR sur l'ADN génomique extrait (figure 17), avec l'ADN-Polymérase « AccuPrime™ Taq » d'Invitrogen. Une première PCR menée avec 2 couples d'amorces a permis l'amplification de l'exon 1 par le couple d'amorces F1-R1 et l'amplification des exons 2, 3 et 4 par le couple d'amorces F2-R2. Les produits PCR ont été séquencés par la méthode SANGER par le prestataire de service Biofidal : le séquençage donne une séquence fiable pour les exons 1, 2 et 4, mais manque de précision pour deux nucléotides de l'exon 3. Une seconde PCR est alors réalisée avec le couple d'amorces F3-R3, permettant l'amplification puis le séquençage de l'exon 3 (figure 17).

F1 :
TCC ACA ACC TTT CAC TAA CAG C

F2 :
CCT TCC CCA GAT TTA GGC CA

F3 :
ACT GCT CCC CTA AAA CTG CA

R1 :
GGG AAG AAG AAG AGG AGG GA

R2 :
GCA ACA GCC AGA CAA GAA CA

R3 :
AAG AAG GGG TGG GGA GAA AG

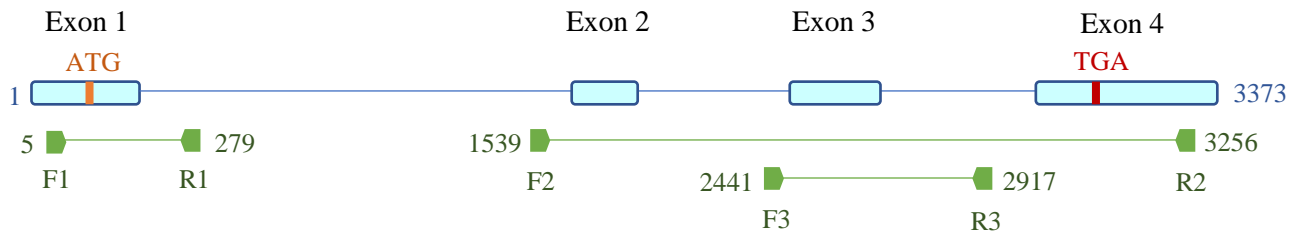


Figure 17 : Amorces et fragments obtenus par PCR sur le gène dMGP

Les 4 exons du gène dMGP ont ainsi été séquencés (figure 18).

Exon 1

1 AA^AACTCCACA ACCTTTCACT AACAGCCTAC AGGAGCCTCT CTCCCCTCTG
 51 CTACTGCACA AGCCAGTGAG ACCAACCCAC AGGACCACGG AGAGACCATG
 101 AAGAGCCTGC TCCTTCTCTC CATTCTGGCT GCCTTGCCG TGGCAGCTTT
 151 GTGCTACG

Exon 2

1 AATCTCATGA AAGTATGGAA TCCTATGAAA TTA

Exon 3

1 ATCCCTTCAT TAACAGGAGA AATGCCAATA CATTATATC TCCGCAACAG
 5 AGATGGAGAG CTAAAGCCCA GGAGAG

Exon 4

1 GATCAGAGAA ACCACCAAGC CCGCCTATGA GCTCAACCGG GAAGCCTGTG
 51 ATGACTTCAA GCTTTGCGAA CGCTACGCCA TGGTTTATGG ATACAATGCT
 101 GCCTACAATC GCTATTTCCG GCATCGCCGA GGAGGCAAAT GAGATTGAAA
 151 AAAGTCTCTT TCCTTCCAGA GCCTGGTGCC TGGTTTTGTA TTCCTTTACA
 201 GTAGCATCAT CGAACTACAT AAACACATAC AAATTGCTTA TTTCTTAAAT
 251 GTTCTTGTCT GGCTGTTGCC CTCCTTCTG CCCCCAGAT CAATAAGCAG
 301 TGAAAGTGCA ATGTGGTGAA AGGTCAAAG AGAATTAAGA TGTGTGATTA
 351 TTATTACATA ATAAACTCTT GGATGGGTAC TTTCA

Figure 18 : Séquences des exons du gène dMGP, obtenues par la méthode SANGER
 Le codon START (ATG) et le codon STOP (TGA) du gène sont soulignés

En vue de l'expression de la protéine dMGP par des bactéries E. Coli, nous avons commandé au laboratoire GENSCRIPT une séquence du gène dMGP optimisée pour ce système d'expression, associée à un site de restriction NdeI en amont du codon START, à un site de restriction Sall en aval du codon STOP et à une séquence de 30 nucléotides codant pour un myc-tag juste en amont du codon STOP. Cet ensemble est fourni intégré à un plasmide pUC57 (figure 19).

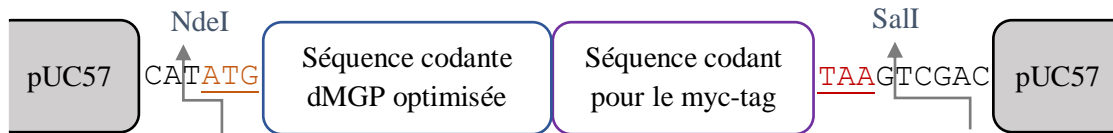


Figure 19 : Organisation du gène dMGP optimisé au sein du plasmide pUC57
Le codon START et le codon STOP du gène dMGP optimisé sont soulignés
Les sites de restriction Sall et NdeI sont repérés par les flèches traversant la séquence

B. Construction et clonage d'un plasmide recombinant pET28b(+)-dMGP

1. Amplification par PCR et purification du gène dMGP optimisé

La séquence codante optimisée a été amplifiée par PCR sur le plasmide pUC57-dMGP, avec l'ADN-Polymérase « AccuPrime™ Taq » d'Invitrogen et le couple d'amorces FNdeI et RSall. La PCR permet l'amplification d'un fragment de 365 paires de bases incluant le site de restriction NdeI, la séquence codante dMGP optimisée, la séquence codant pour le myc-tag et le site de restriction Sall (figure 20).

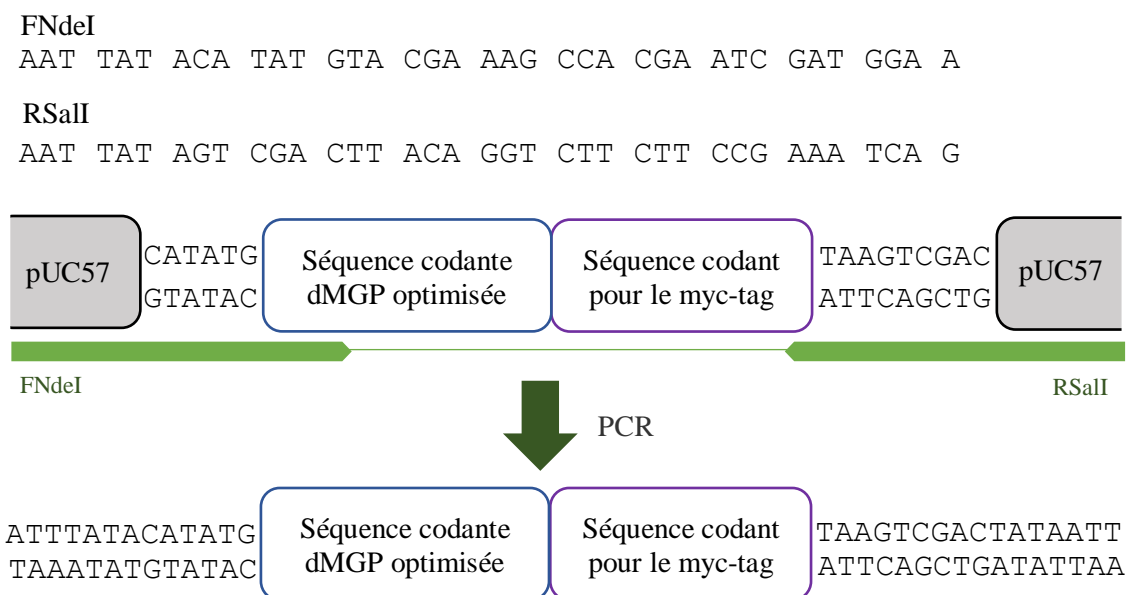


Figure 20 : Amorces et fragment obtenu par PCR sur le plasmide pUC57-dMGP

Le gène dMGP amplifié par PCR a ensuite été purifié sur gel d'agarose à 1,2% à l'aide du kit « NucleoSpin Gel and PCR clean-up » de Qiagen, permettant d'obtenir un échantillon de bonne pureté (tableau VII).

Tableau VII : Concentration et pureté du produit d'amplification PCR après purification sur gel d'agarose
Un rapport A260/A280 égal à 1,8 caractérise un échantillon d'ADN pur

	dMGP optimisé PCR
Concentration (ng/μL)	73,9 ng/μL
A₂₆₀ / A₂₈₀	1,82

2. Hydrolyse du plasmide pET28b(+) et du gène dMGP optimisé

Le plasmide pET28b et le gène dMGP ont chacun été hydrolysés par les enzymes de restrictions NdeI et SalI de Promega avec incubation à 37°C pendant 12 heures pour l'hydrolyse du pET28b et incubation à 37°C pendant 2 heures pour l'hydrolyse du gène (figure 21).

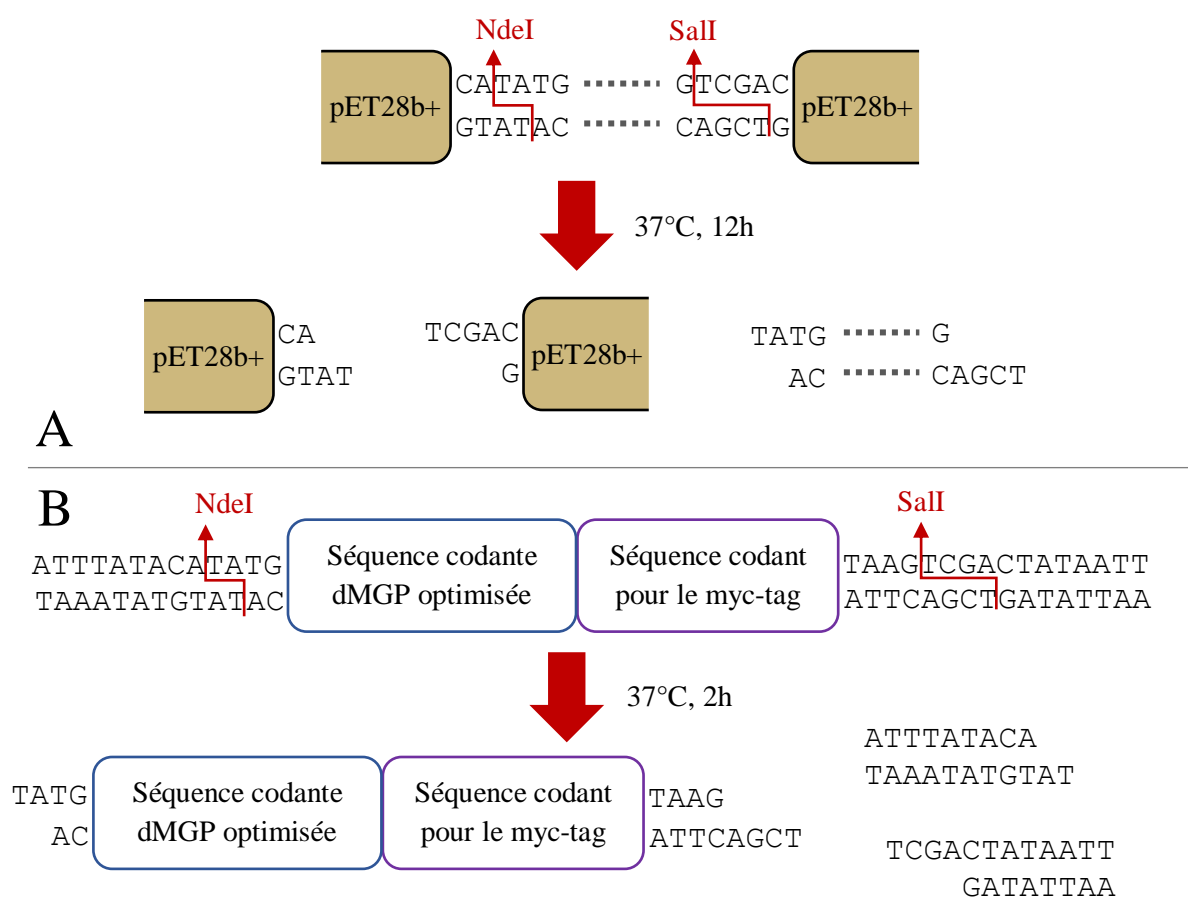


Figure 21 : Produits de l'hydrolyse par les enzymes de restriction NdeI et SalI
A : produits de l'hydrolyse du plasmide pET28b(+)
B : produits de l'hydrolyse de l'insert dMGP optimisé

Les produits d'hydrolyse du plasmide pET28b(+) et de l'insert dMGP optimisé ont été purifiés avec le kit « NucleoSpin Gel and PCR clean-up », respectivement sur gel d'agarose à 1,2% et sur colonne, permettant d'obtenir des échantillons de pureté satisfaisante (tableau VIII).

Tableau VIII : Concentration et pureté des produits d'hydrolyse par NdeI et SalI après purification
Un rapport A260/A280 égal à 1,8 caractérise un échantillon d'ADN pur

	pET28b+ hydrolysé	dMGP hydrolysé
Concentration (ng/μL)	11,5 ng/μL (0,003 pmol/μL)	50,8 ng/μL (0,26 pmol/μL)
A₂₆₀ / A₂₈₀	1,851	1,872

3. Ligation du plasmide pET28b(+) et du gène dMGP digérés

Le plasmide pET28b+ et l'insert dMGP hydrolysés ont été ligués avec la ligase « Anza T4 DNA ligase Master Mix » d'Invitrogen, avec incubation à température ambiante pendant 90 minutes (figure 22). Un rapport 3:1 entre la quantité de matière d'insert (0,10 pmol) et la quantité de matière de plasmide (0,031 pmol) placés en réaction a été respecté.

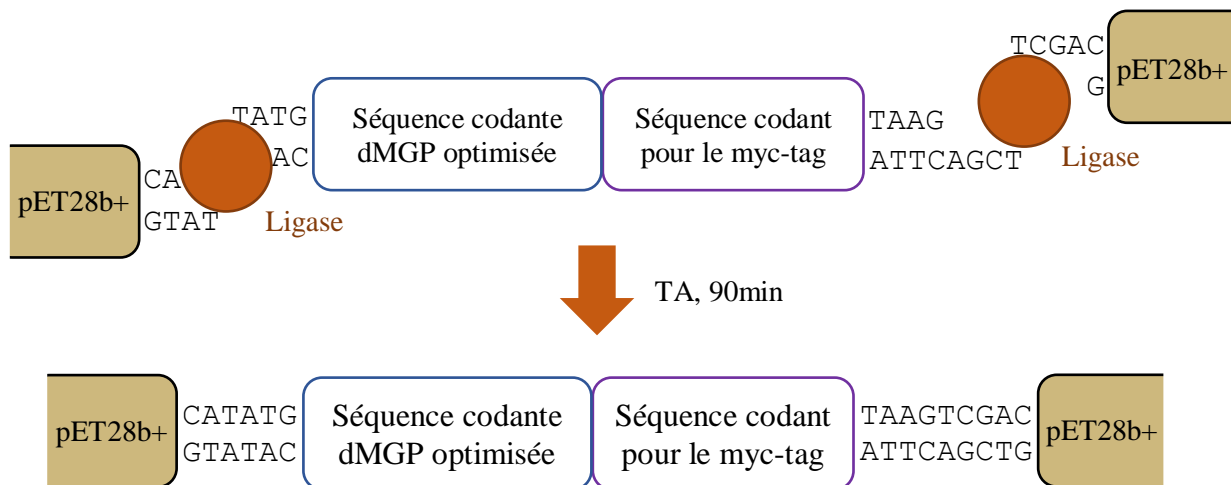


Figure 22 : Ligation du plasmide pET28b(+) et de l'insert dMGP optimisé

4. Transformation bactérienne et clonage du plasmide recombinant pET28b-dMGP

Nous avons transformé 25 μL de bactéries compétentes *E. coli* de souche HST08 « Stellar competent cells » de Clontech avec 1,5 μL du produit de ligation pET28b(+)-dMGP obtenu, en soumettant les bactéries à une succession de chocs thermiques en présence du produit de ligation : 7 minutes sur glace sans eau, 30 secondes à 42 °C, et 2 minutes sur glace sans eau. Nous avons ensuite incubé les bactéries dans 250 μL de milieu « SOC » liquide sans antibiotique à 37 °C pendant 2 heures, puis sur milieu solide Lysogeny Broth (LB) agar à 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamycine à 37 °C pendant 12h (figure 23). L'ensemble des manipulations est effectué de manière stérile.

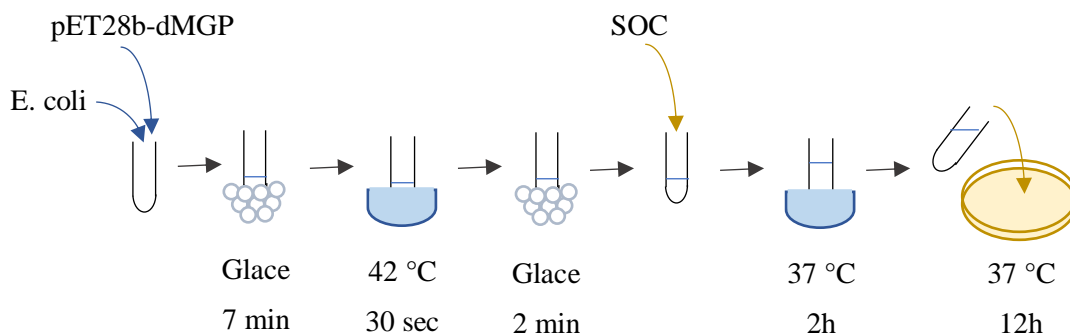


Figure 23 : Protocole de transformation bactérienne.

A l'issue de cette incubation, 9 colonies étaient observables. Chacune de ces colonies a été mise en culture dans 3 mL de milieu liquide LB à 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamycine, à 37 °C pendant 8 heures. Une PCR a été réalisée sur chaque culture, avec l'ADN-Polymérase « AccuPrime™ Taq » d'Invitrogen et le couple d'amorces FNdeI et RSaII, afin de déterminer lesquelles étaient issues d'un clone ayant intégré le plasmide recombinant pET28b(+)-dMGP. Une extraction de plasmide a alors été réalisée sur l'une des cultures positives à l'aide du kit « Plasmid Midi kit » de Qiagen, permettant d'obtenir un échantillon de pureté satisfaisante (tableau IX). L'échantillon a ensuite été séquencé par la méthode SANGER par le prestataire de services Biofidal.

Tableau IX : Concentration et pureté du plasmide extrait d'une culture positive après transformation avec le produit de ligation pET28b(+)-dMGP

Un rapport A_{260}/A_{280} égal à 1,8 caractérise un échantillon d'ADN pur

	pET28b(+)-dMGP
Concentration (ng/μL)	129,1 ng/ μL
A_{260} / A_{280}	1,839

C. Expression du gène dMGP et purification de la protéine recombinante

1. Transformation bactérienne et induction de l'expression du gène dMGP

Nous avons transformé 20 μL de bactéries compétentes *E. coli* « BL21(DE3) » de NewEngland BioLabs avec 2 μL du plasmide recombinant pET28b(+)-dMGP, en soumettant les bactéries à une succession de chocs thermiques en présence du plasmide recombinant : 7 minutes sur glace sans eau, 30 secondes à 42 °C, et 2 minutes sur glace sans eau. Nous avons ensuite incubé les bactéries dans 250 μL de milieu « SOC » liquide sans antibiotique à 37 °C pendant 2 heures, puis dans 3 mL de milieu liquide LB à 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamycine à 37 °C pendant 12h. De la culture obtenue, 200 μL ont été prélevés pour inoculer 12 mL de milieu liquide LB à 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamycine, incubés à 37°C pendant 12 heures.

La totalité des 12 mL de culture obtenus ont été inoculés à 1 L de milieu de culture Terrific Broth (TB) sans antibiotique, mis à incuber à 37°C. Nous avons mesuré régulièrement, par spectrophotométrie, l'absorbance à 600 nm de la culture : quand l'absorbance à 600 nm a atteint 0,6, nous avons induit l'expression du gène dMGP par ajout d'IPTG à la concentration finale de 150 $\mu\text{mol}/\text{L}$, puis incubé à 28°C pendant 18 heures.

2. Purification protéique

Toutes les manipulations suivantes ont été effectuées sur glace sans eau ou à +4 °C.

La culture bactérienne a été centrifugée à 20 minutes à 4696 g, à +4 °C. Le culot bactérien a été repris dans 20 mL de tampon de pH = 7,4 à 20 mmol/L de phosphate, 250 mmol/L de NaCl, 20 mmol/L d'imidazole et 300 mmol/L d'urée. Après ajout de lysozyme, nous avons incubé la suspension de bactéries à +4°C sous agitation pendant 30 minutes, puis avons soumis les bactéries aux ultrasons à raison de 5 sonications de 30 secondes séparées d'1 minute, avec refroidissement en glace sans eau pendant et entre chaque sonication. Le lysat a ensuite été incubé à +4°C sous agitation pendant 1 heure, puis centrifugé 25 minutes à 20000 g, à +4°C.

La dMGP est censée être soluble au pH de 7,4, nous avons donc dans un premier temps purifié le surnageant de lysat. La protéine dMGP synthétisée étant juxtaposée à un site poly-histidine, nous avons choisi de la purifier sur une colonne de nickel « HisTrap 5 mL » de Healthcare en utilisant l'automate de purification ÄKTASTART de Healthcare.

La colonne de nickel et l'automate ont été rincés avec 50 mL d'eau distillée, puis la colonne a été équilibrée à raison de 2 mL/min avec 50 mL de tampon d'équilibration : tampon de pH = 7,4 à 20 mmol/L de phosphate, 250 mmol/L de NaCl, 20 mmol/L d'imidazole, 300 mmol/L d'urée et 2% de Triton X-100.

Le dépôt des 20 mL de surnageant de protéines a été effectué à 0,5 mL/min.

Deux tampons de lavages ont été utilisés : le tampon de lavage A est identique au tampon d'équilibration ; le tampon de lavage B est un tampon de pH = 7,4 à 20 mmol/L de phosphate, 250 mmol/L de NaCl et 20 mmol/L d'imidazole. La colonne a été lavée à raison de 2 mL/min, d'abord avec 40 mL de tampon de lavage A, puis avec 30 mL d'un mélange 67% tampon A – 33% tampon B, puis avec 30 mL d'un mélange 33% tampon A – 67% tampon B, enfin avec 40 mL de tampon de lavage B.

L'éluion a été faite par fractions de 2 mL à raison de 2 mL/min avec 30 mL de tampon d'éluion : tampon de pH = 7,4, à 20 mmol/L de phosphate, 250 mmol/L de NaCl et 500 mmol/L d'imidazole. Nous avons ainsi récolté 15 fractions d'éluât de 2 mL.

Ce protocole n'a pas permis de purifier la dMGP synthétisée. Une électrophorèse (SDS-PAGE) d'échantillons du lysat, du culot et du surnageant révélée par western blot reconnaissant le myc-tag de la dMGP synthétique a mis en évidence la présence de la protéine dans le lysat et dans le culot, mais pas dans le surnageant. Nous avons donc réalisé une purification du culot de lysat.

Le culot a été repris dans 20 mL de tampon de pH = 7,4 à 20 mmol/L de phosphate, 250 mmol/L de NaCl, 20 mmol/L d'imidazole, 300 mmol/L d'urée et 2% de Triton X-100, puis incubé à +4°C sous agitation pendant 1 heure. La resuspension a ensuite été centrifugée 25 minutes à 20000 g, à +4°C. Le surnageant est récupéré pour la purification.

La purification a ensuite été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, permettant d'obtenir 15 fractions d'éluât de 2 mL.

II. Résultats

A. Séquence codante reconstruite du gène dMGP

Le séquençage par méthode SANGER a permis d'obtenir les séquences des 4 exons constituant le gène dMGP. La séquence codante du gène dMGP a ainsi été reconstruite (figure 24), permettant de confirmer la séquence accessible sur la base de données NCBI (référence NCBI : XM_003639976.4, geneID : 100856382).

```
1  ATGAAGAGCC TGCTCCTTCT CTCCATTCTG GCTGCCTTGG CCGTGGCAGC
51 TTTGTGCTAC GAATCTCATG AAAGTATGGA ATCCTATGAA ATTAATCCCT
101 TCATTAACAG GAGAAATGCC AATACATTTA TATCTCCGCA ACAGAGATGG
151 AGAGCTAAAG CCCAGGAGAG GATCAGAGAA ACCACCAAGC CCGCCTATGA
201 GCTCAACCGG GAAGCCTGTG ATGACTTCAA GCTTTGCGAA CGCTACGCCA
251 TGGTTTATGG ATACAATGCT GCCTACAATC GCTATTTCCG GCATCGCCGA
301 GGAGGCAAA TGA
```

Figure 24 : Séquence codante reconstruite du gène dMGP
Le codon START et le codon STOP sont soulignés

B. Séquence du plasmide recombinant pET28b(+)-dMGP

Le séquençage par méthode SANGER du plasmide recombinant extrait confirme la bonne intégration du gène dMGP optimisé au plasmide pET28b(+) (figure 25). Après le codon START, compris dans le plasmide, se trouvent 9 nucléotides puis la séquence du pET28b(+) qui code pour un poly-histidine. Cette séquence est séparée du gène dMGP par une chaîne de 33 nucléotides. La séquence codant pour le Myc-tag se trouve juste en aval du gène dMGP et est suivie du codon STOP.

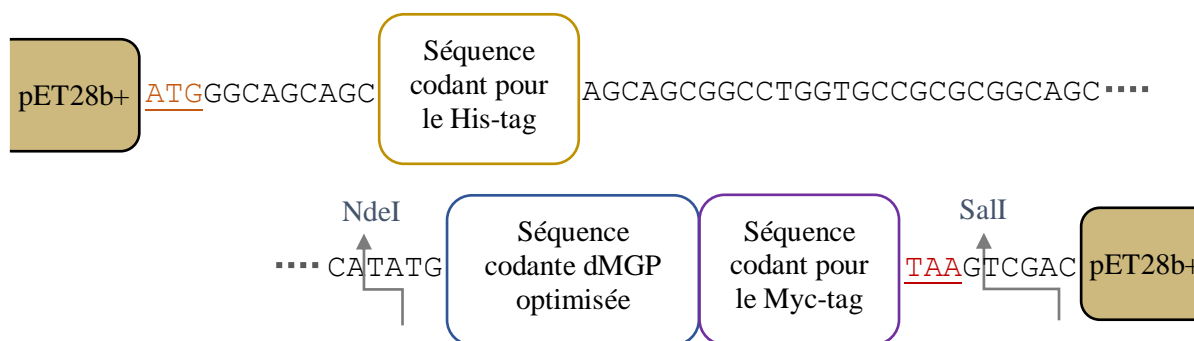
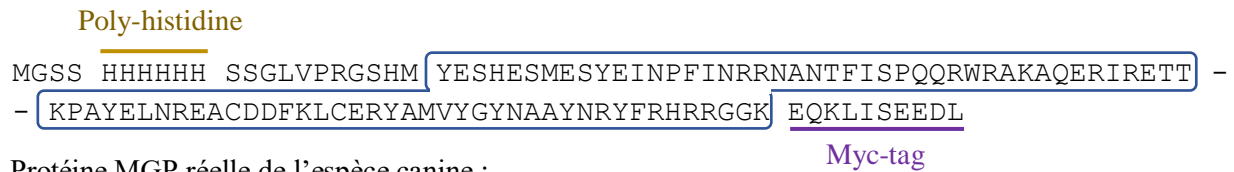


Figure 25 : Séquence codante du plasmide recombinant pET28b(+)-dMGP
Le codon START et le codon STOP sont soulignés ; les sites de restriction SalI et NdeI sont repérés par les flèches traversant la séquence

Ainsi, après traduction, la protéine MGP synthétisée est semblable mais pas identique à la protéine MGP canine mature (figure 26) : la protéine synthétisée contient une séquence de 84 acides aminés identique à la protéine dMGP mature ; à son extrémité N-terminale se trouve une séquence de 4 acides aminés suivie d'un poly-histidine à 6 histidines, puis une séquence de 11 acides aminés ; à son extrémité C-terminale se trouve le Myc-tag.

Protéine MGP recombinante :



Protéine MGP réelle de l'espèce canine :



*Figure 26 : Protéine recombinante obtenue après traduction de la séquence codante du pET28b(+)-dMGP et comparaison avec la protéine dMGP réelle
 La séquence d'acides aminés identique aux deux protéines est entourée*

L'ajout de la séquence poly-histidine à l'extrémité N-terminale permet la purification de la protéine recombinante par fixation sur une colonne de nickel. Le Myc-tag en C-terminal peut être reconnu spécifiquement par des anticorps en vue d'une révélation d'électrophorèse par Western-blot.

C. Electrophorèse des produits de purification protéique

1. Purification protéique sur le surnageant de lysat

Des échantillons ont été prélevés à plusieurs étapes de la purification. Après reprise du culot bactérien, nous avons prélevé un échantillon du lysat juste après sonication (appelé « Lysat »), ainsi qu'un échantillon du surnageant et un échantillon du culot obtenus par centrifugation à 20000 g (appelés respectivement « Surnageant » et « Culot »). Pendant la purification sur colonne de nickel, nous avons prélevé un échantillon du sous-dépôt (appelé « Dépôt ») et du premier sous-lavage (appelé « Lavage »), puis un échantillon de chaque fraction d'éluât.

Nous avons réalisé une électrophorèse sur SDS-PAGE des échantillons prélevés pendant la purification protéique du surnageant de lysat, avec révélation par coloration au bleu de coomasie.

L'électrophorèse met en évidence l'absence de protéine compatible avec la dMGP synthétique dans l'ensemble des échantillons (figure 27).

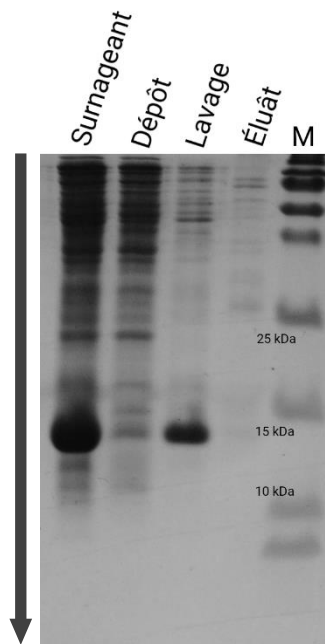


Figure 27 : Electrophorèse (SDS-PAGE) de l'échantillon de surnageant de lysat et des échantillons de purification sur colonne de nickel du surnageant
Le sens de migration est indiqué par la flèche verticale
Révélation par coloration au bleu de coomasie
M = marqueur de taille (4,6 – 300 kDa)

Une électrophorèse sur SDS-PAGE des échantillons « Lysat », « Surnageant » et « Culot » a alors été réalisée et révélée par western blot reconnaissant le myc-tag.

Le Western-blot met en évidence un signal myc-tag intense à hauteur du marqueur 15 kDa pour les échantillons « Lysat » et « Culot », et un signal faible à la même hauteur pour l'échantillon « Surnageant » (figure 28). Il apparaît donc que la protéine dMGP (juxtaposée à un myc-tag) a bien été synthétisée, mais ne serait pas aussi soluble qu'attendue et est donc majoritairement présente dans le culot de lysat.

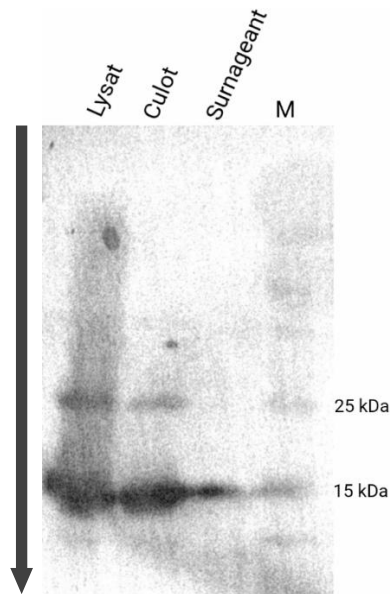


Figure 28 : Electrophorèse (SDS-PAGE) des échantillons après lyse bactérienne
 Le sens de migration est indiqué par la flèche verticale
 Révélation par Western-blot avec reconnaissance du Myc-tag
 M = marqueur de taille (4,6 – 300 kDa)

2. Purification protéique sur le culot de lysat

Après re-suspension du culot de lysat, nous avons prélevé un échantillon du surnageant obtenu après la centrifugation à 20000 g (appelé « Solubilisat »). Pendant la purification sur colonne de nickel, nous avons prélevé un échantillon du sous-dépôt (appelé « Dépôt ») et du premier sous-lavage (appelé « Lavage »), puis un échantillon de chaque fraction d'éluât.

La lecture de la courbe d'absorbance en UV pendant la purification protéique sur l'ÄKTASTART (figure 29) montre :

- une très forte augmentation de l'absorbance pendant le dépôt, au-delà du plafond de mesure, à corréliser avec la quantité totale de protéines importante ;
- une diminution rapide de l'absorbance jusqu'à 0 mAU puis un maintien constant de l'absorbance pendant le lavage, permettant de supposer qu'aucune protéine fixée à la colonne n'a été éluée durant le lavage
- une augmentation de la valeur de base de l'absorbance à environ 200 mAU au début de l'éluât, à mettre en relation avec la concentration importante en imidazole du tampon d'éluât, puis un pic d'absorbance à 600 mAU témoignant de la probable éluât de protéine(s).

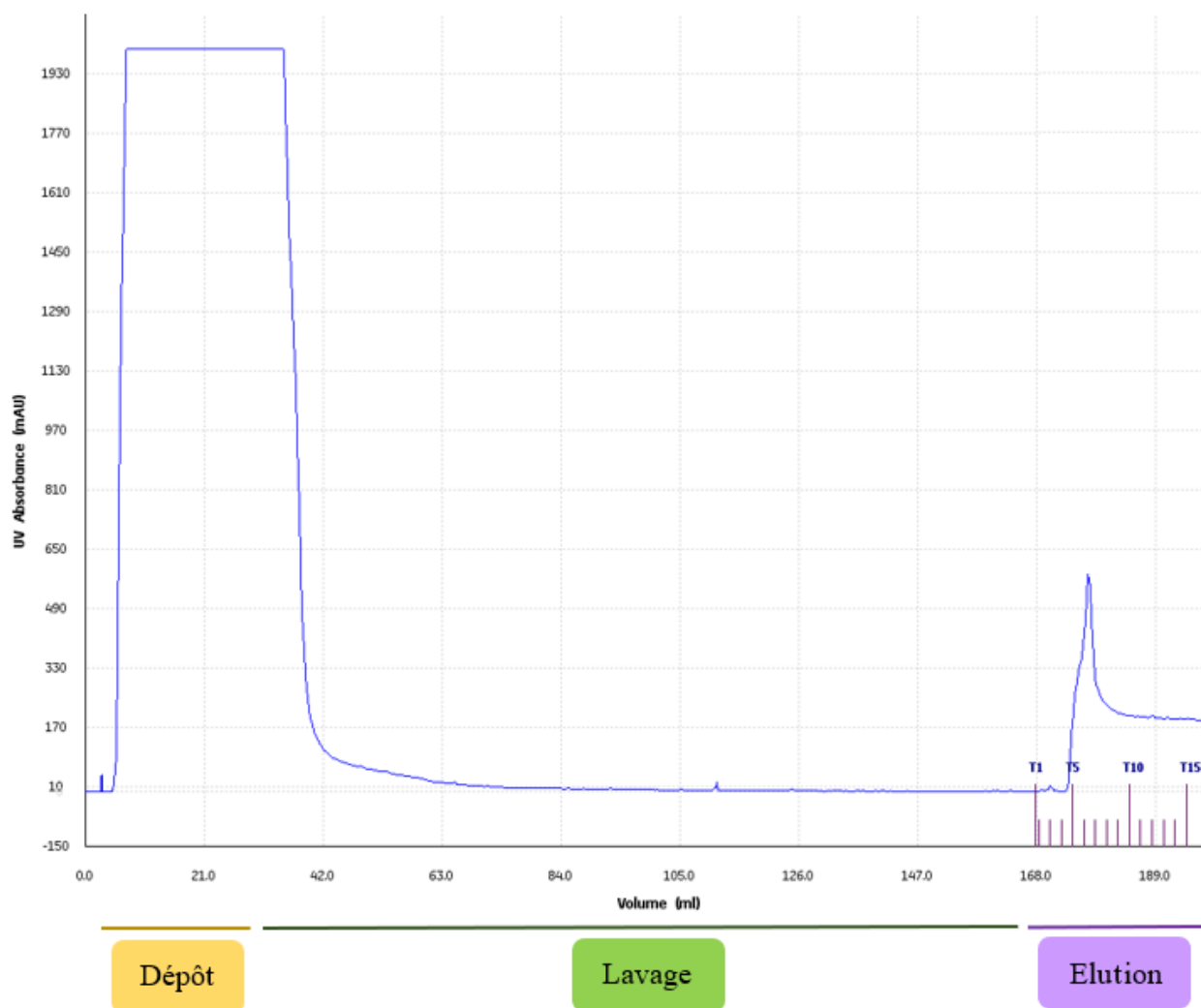


Figure 29 : Evolution de l'absorbance UV en sortie de colonne de nickel au cours de la purification

Ainsi, les fractions d'éluât 5 à 9 apparaissent comme les plus susceptibles de contenir les protéines éluées. Une électrophorèse sur SDS-PAGE des échantillons « Solubilisé », « Dépôt », « Lavage », et des fractions d'éluât 4 à 9 a été réalisée, avec révélation par coloration au bleu de Coomassie et par Western-blot avec reconnaissance du myc-tag.

La révélation au Western-blot met en évidence un signal modéré à hauteur du marqueur 15 kDa pour l'échantillon « Solubilisé » et pour les fractions d'éluât 6, 7, 8 et 9 (figure 30). Il apparaît donc que la protéine dMGP synthétisée a été correctement solubilisée depuis le culot de lysat puis correctement éluée par l'imidazole. La révélation par coloration au bleu de Coomassie révèle une fine bande à hauteur du marqueur de 15 kDa pour les fractions 6, 7, 8 et 9, dont l'intensité est la plus forte pour les fractions 7 et 8. D'autres bandes sont observables, notamment au niveau du marqueur de 25 kDa pour les fractions 5 et 6. La fraction 8 apparaît donc comme la plus intéressante en termes de pureté et de concentration en dMGP (figure 30).

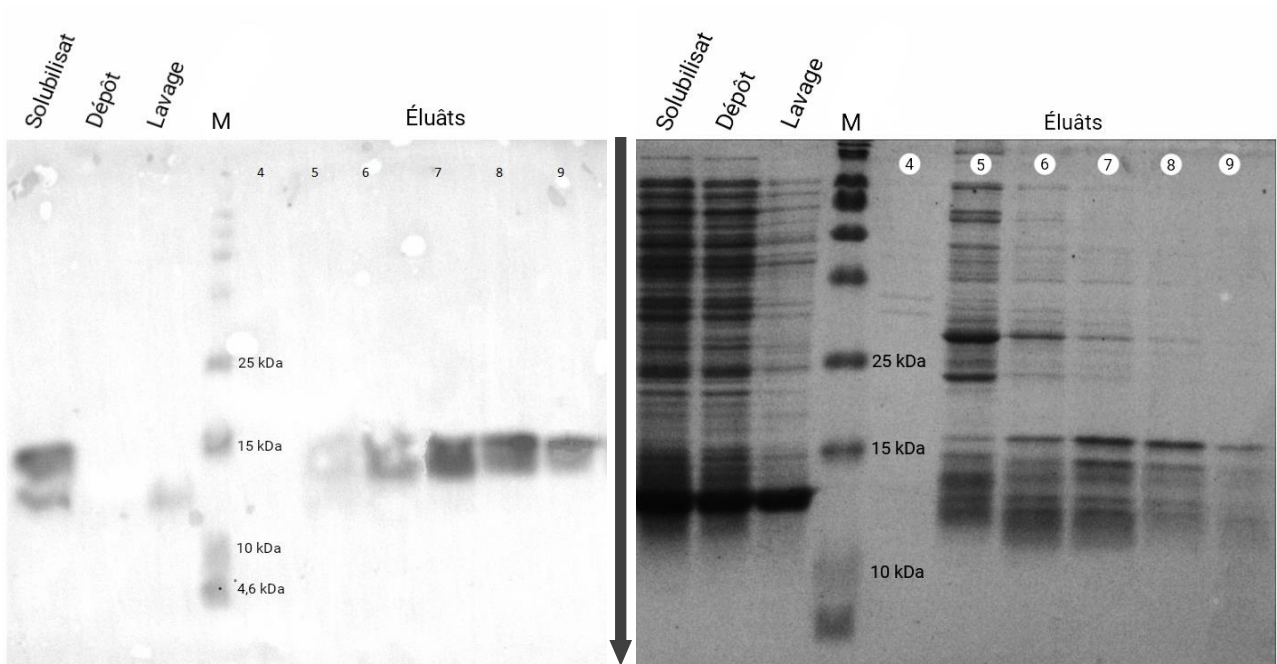


Figure 30 : Electrophorèse (SDS-PAGE) de l'échantillon de solubilisation du culot de lysat et des échantillons de purification sur colonne de nickel du solubilisat
 Le sens de migration est indiqué par la flèche verticale
 A gauche : révélation par Western-blot avec reconnaissance du Myc-tag
 A droite : révélation par coloration au bleu de Coomassie
 M = marqueur de taille (4,6 – 300 kDa)

Un dosage de protéines totales a été réalisé sur un échantillon de la fraction d'éluat 8, et donne une concentration de 300 ng/mL. Cet échantillon a également été dosé par le test ELISA « MyBioSource human Matrix Gla Protein ELISA Kit » et donne une valeur du même ordre.

III. Discussion

A. Nature de la protéine purifiée

Plusieurs données permettent de conclure que la protéine purifiée est bien la Matrix Gla Protein synthétique.

L'électrophorèse de la protéine purifiée permet l'observation de bandes situées à environ 15 kDa, compatible avec la MGP synthétique d'une taille de 13,8 kDa. De plus, la protéine purifiée est restée fixée à la colonne de nickel pendant les étapes de dépôt et de lavages et a été éluée par augmentation de la concentration en imidazole, ce qui est en faveur de la présence d'une séquence poly-histidine ; les anticorps reconnaissant le myc-tag, utilisés pour le Western blot, permettent l'obtention d'un bon signal, ce qui atteste de la présence de la séquence myc-tag.

B. Pureté de la dMGP synthétique

L'observation de l'électrophorèse révélée au bleu de Coomassie montre la présence, dans l'éluât, d'autres protéines que la dMGP synthétisée. La majorité de ces protéines se trouve dans la fraction d'éluât 5, en quantité modérée : leur présence dans l'éluât relève probablement d'une fixation non spécifique de ces protéines à la colonne de nickel. Une modification du protocole de purification, avec augmentation de la concentration en NaCl de 250 à 500 mmol/L dans chaque tampon, permettrait de diminuer les liaisons non spécifiques à la colonne et donc d'améliorer la pureté de l'éluât en protéine dMGP synthétique.

C. Concentration et expression de la protéine synthétique purifiée

L'électrophorèse de l'échantillon « Solubilisé » révélée par coloration au bleu de Coomassie ne met pas en évidence de bande de forte intensité à la hauteur attendue pour la protéine dMGP synthétique. D'une part, la lecture est rendue difficile par la présence de nombreuses protéines dans l'échantillon, dont le lysozyme qui forme une très épaisse bande inférieure à 15 kDa ; d'autre part, il est possible que la dMGP synthétique n'ait pas été fortement exprimée après induction par l'IPTG, ou que la solubilisation des protéines à partir du culot de lysat n'ait pas été suffisante.

Une première solution passerait par l'utilisation d'autres cellules compétentes. En effet, la dMGP synthétique est théoriquement hydrosoluble aux pH du milieu d'expression et des tampons de purification, mais se trouve dans le culot de lysat après centrifugation, ce qui

témoigne d'une potentielle toxicité de la dMGP synthétisée vis-à-vis des bactéries hôtes. L'acquisition de la cinétique de croissance bactérienne durant l'expression permettrait de mieux comprendre ce bas niveau d'expression, et de mettre en évidence ce possible effet toxique de la dMGP synthétique sur les bactéries choisies.

L'utilisation de cellules compétentes capables de réguler l'expression par inhibition du promoteur T7 pourrait permettre de diminuer la quantité de dMGP synthétisée, limitant ainsi l'effet toxique de cette protéine sur les bactéries hôtes et améliorant finalement le niveau d'expression.

D. Séquence de la protéine dMGP synthétisée

Dans l'optique de son utilisation pour la mise au point d'un standard analytique de la dpucMGP canine, une forte homologie entre la dMGP synthétisée et la dpucMGP canine est idéale. Or, la protéine synthétisée durant nos travaux présente une séquence exactement homologue à la dpucMGP canine, mais à laquelle des séquences sont juxtaposées en N-terminal et en C-terminal.

La séquence de la dMGP synthétique ne peut guère être optimisée : le poly-histidine est nécessaire à la purification sur colonne de nickel, et le myc-tag permet l'identification spécifique de la protéine ; la suppression de la séquence comprise entre le poly-histidine et la séquence dMGP est possible, mais pourrait altérer la conformation tridimensionnelle correcte de la protéine par rapprochement du poly-histidine de la séquence d'intérêt. L'ajout de sites de clivages entre la séquence dMGP et le poly-histidine et entre la séquence dMGP et le myc-tag est envisageable : cela permettrait d'éliminer les séquences accessoires de la séquence d'intérêt une fois la protéine synthétique purifiée, mais nécessiterait l'utilisation de protéases et donc l'ajout d'une ultime étape de purification.

E. Dosage de la dpucMGP canine avec le kit ELISA dpucMGP humaine

La dpucMGP canine apparaît parfaitement reconnue par le kit ELISA dpucMGP humaine, mais nous n'avons pas de recul quant à la spécificité de cette reconnaissance.

Le dosage de la dpucMGP plasmatique canine par des tests immunologiques utilisant des anticorps anti dpucMGP humaine est possible, et permettrait de mesurer la dpucMGP chez des chiens atteints d'insuffisance rénale chronique à différents stades, afin de déterminer si les mêmes observations peuvent être faites chez le Chien et chez l'Homme.

IV. Conclusion

Ces travaux ont permis la synthèse d'une protéine dMGP recombinante de séquence très proche de la dMGP réelle, pouvant servir au développement d'un standard analytique de la dpucMGP chez le Chien. Quelques limites ont toutefois été constatées : l'expérimentation d'autres protocoles d'expression et de purification pourrait permettre d'augmenter la quantité et la pureté de la protéine synthétisée, et donc le rendement de la synthèse.

La dpucMGP produite est parfaitement reconnue par les anticorps anti dpucMGP humaine. Il apparaît donc que le dosage de la dpucMGP canine peut être réalisé par un test immunologique utilisant des anticorps anti dpucMGP humaine. Il devient donc possible d'évaluer la pertinence de ce paramètre biologique en tant que marqueur de la calcification chez le chien atteint d'insuffisance rénale.

Conclusion

Chez l'Homme et le Rat, l'insuffisance rénale chronique est associée à une augmentation de la prévalence et de la sévérité de la calcification vasculaire et à un déficit en vitamine K fonctionnelle, qui participe à l'augmentation de la morbidité de l'insuffisance rénale chronique. Le dosage de la dpucMGP plasmatique est un outil intéressant d'exploration de la calcification vasculaire et de l'insuffisance rénale chronique chez l'Homme et le Rat. L'insuffisance rénale chronique est une maladie très fréquente chez le Chien : c'est pourquoi nous avons visé à développer un standard analytique de la dpucMGP plasmatique canine, afin d'apporter un outil supplémentaire dans l'exploration et l'étude de cette maladie et de la calcification artérielle qui pourrait y être associée.

Pour ce faire, nous avons choisi la synthèse d'une protéine recombinante par *E. coli* avec le plasmide pET28b(+), purifiée sur une colonne de nickel. Ces travaux ont permis la synthèse d'une protéine dMGP recombinante de séquence très proche de celle de la dMGP réelle, pouvant servir au développement d'un standard analytique de la dpucMGP chez le Chien. Quelques limites ont toutefois été constatées : la mise en place d'autres protocoles d'expression et de purification pourrait permettre d'augmenter la quantité et la pureté de la protéine synthétisée.

La dpucMGP produite est parfaitement reconnue par les anticorps anti dpucMGP humaine. Il apparaît donc que le dosage de la dpucMGP canine peut être réalisé par un test immunologique utilisant des anticorps anti dpucMGP humaine. Il devient donc possible d'évaluer la pertinence de ce paramètre biologique en tant que marqueur de la calcification chez le chien atteint d'insuffisance rénale.

Bibliographie

- Ansell J., Hirsh J., Hylek E., Jacobson A., Crowther M., Palareti G., 2008. Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 133, 160S-198S. <https://doi.org/10.1378/chest.08-0670>
- Aoun M., Makki M., Azar H., Matta H., Chelala D.N., 2017. High Dephosphorylated-Uncarboxylated MGP in Hemodialysis patients: risk factors and response to vitamin K2, A pre-post intervention clinical trial. *BMC Nephrol.* 18. <https://doi.org/10.1186/s12882-017-0609-3>
- Bjorklund G., Svanberg E., Dadar M., Card D.J., Chirumbolo S., Harrington D.J., Aaseth J., 2018. The role of matrix Gla protein (MGP) in vascular calcification. *Curr. Med. Chem.* <https://doi.org/10.2174/0929867325666180716104159>
- Booth S.L., Suttie J.W., 1998. Dietary Intake and Adequacy of Vitamin K. *J. Nutr.* 128, 785–788. <https://doi.org/10.1093/jn/128.5.785>
- Boström K., Tsao D., Shen S., Wang Y., Demer L.L., 2001. Matrix GLA Protein Modulates Differentiation Induced by Bone Morphogenetic Protein-2 in C3H10T1/2 Cells. *J. Biol. Chem.* 276, 14044–14052. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008103200>
- Caluwé R., Vandecasteele S., Van Vlem B., Vermeer C., Vriese D., S A., 2014. Vitamin K2 supplementation in haemodialysis patients: a randomized dose-finding study. *Nephrol. Dial. Transplant.* 29, 1385–1390. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft464>
- Chan K.E., Lazarus J.M., Thadhani R., Hakim R.M., 2009. Warfarin Use Associates with Increased Risk for Stroke in Hemodialysis Patients with Atrial Fibrillation. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20, 2223–2233. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009030319>
- Chen N.X., Moe S.M., 2015. Pathophysiology of Vascular Calcification. *Curr. Osteoporos. Rep.* 13, 372–380. <https://doi.org/10.1007/s11914-015-0293-9>
- Coates T., Kirkland G.S., Dymock R.B., Murphy B.F., Brealey J.K., Mathew T.H., Disney A.P., 1998. Cutaneous necrosis from calcific uremic arteriopathy. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 32, 384–391.
- Conly J.M., Stein K., Worobetz L., Rutledge-Harding S., 1994. The contribution of vitamin K2 (menaquinones) produced by the intestinal microflora to human nutritional requirements for vitamin K. *Am. J. Gastroenterol.* 89, 915–923.
- Disthabanchong S., 2012. Vascular calcification in chronic kidney disease: Pathogenesis and clinical implication. *World J. Nephrol.* 1, 43–53. <https://doi.org/10.5527/wjn.v1.i2.43>
- Fraser J.D., Price P.A., 1988. Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla protein. Implications for the possible functions of matrix Gla protein and for the tissue distribution of the gamma-carboxylase. *J. Biol. Chem.* 263, 11033–11036.
- Fusaro M., Mereu M.C., Aghi A., Iervasi G., Gallieni M., 2017a. Vitamin K and bone. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* 14, 200–206. <https://doi.org/10.11138/ccmbm/2017.14.1.200>
- Fusaro M., Plebani M., Iervasi G., Gallieni M., 2017b. Vitamin K Deficiency in Chronic Kidney Disease: Evidence Is Building Up. *Am. J. Nephrol.* 45, 1–3. <https://doi.org/10.1159/000451070>
- Fusaro M., Tripepi G., Noale M., Plebani M., Zaninotto M., Piccoli A., Naso A., Miozzo D., Giannini S., Avolio M., Foschi A., Rizzo M.A., Gallieni M., Vertebral Fractures And Vascular Calcifications Study Group, 2015. Prevalence of vertebral fractures, vascular calcifications, and mortality in warfarin treated hemodialysis patients. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 13, 248–258.

- Gage B.F., Birman-Deych E., Radford M.J., Nilasena D.S., Binder E.F., 2006. Risk of osteoporotic fracture in elderly patients taking warfarin: results from the National Registry of Atrial Fibrillation 2. *Arch. Intern. Med.* 166, 241–246. <https://doi.org/10.1001/archinte.166.2.241>
- Goodman W.G., Goldin J., Kuizon B.D., Yoon C., Gales B., Sider D., Wang Y., Chung J., Emerick A., Greaser L., Elashoff R.M., Salusky I.B., 2000. Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N. Engl. J. Med.* 342, 1478–1483. <https://doi.org/10.1056/NEJM200005183422003>
- Harbuzova V.I., Ataman O.V., 2011. [Matrix Gla-protein and its role in vascular wall calcification]. *Fiziolohichniy Zhurnal Kiev Ukr.* 1994 57, 96–112.
- Hirota Y., Nakagawa K., Sawada N., Okuda N., Suhara Y., Uchino Y., Kimoto T., Funahashi N., Kamao M., Tsugawa N., Okano T., 2015. Functional Characterization of the Vitamin K2 Biosynthetic Enzyme UBIAD1. *PLOS ONE* 10, e0125737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125737>
- Hirota Y., Tsugawa N., Nakagawa K., Suhara Y., Tanaka K., Uchino Y., Takeuchi A., Sawada N., Kamao M., Wada A., Okitsu T., Okano T., 2013. Menadione (Vitamin K3) Is a Catabolic Product of Oral Phylloquinone (Vitamin K1) in the Intestine and a Circulating Precursor of Tissue Menaquinone-4 (Vitamin K2) in Rats. *J. Biol. Chem.* 288, 33071–33080. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.477356>
- Hunt J.L., Fairman R., Mitchell M.E., Carpenter J.P., Golden M., Khalapyan T., Wolfe M., Neschis D., Milner R., Scoll B., Cusack A., Mohler E.R., 2002. Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. *Stroke* 33, 1214–1219.
- Ibels L.S., Alfrey A.C., Huffer W.E., Craswell P.W., Anderson J.T., Weil R., 1979. Arterial calcification and pathology in uremic patients undergoing dialysis. *Am. J. Med.* 66, 790–796. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(79\)91118-5](https://doi.org/10.1016/0002-9343(79)91118-5)
- Jono S., McKee M.D., Murry C.E., Shioi A., Nishizawa Y., Mori K., Morii H., Giachelli C.M., 2000. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ. Res.* 87, E10-17.
- Kaesler N., Magdeleyns E., Herfs M., Schettgen T., Brandenburg V., Fliser D., Vermeer C., Floege J., Schlieper G., Krüger T., 2014. Impaired vitamin K recycling in uremia is rescued by vitamin K supplementation. *Kidney Int.* 86, 286–293. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.530>
- Kurnatowska I., Grzelak P., Masajtis-Zagajewska A., Kaczmarek M., Stefańczyk L., Vermeer C., Maresz K., Nowicki M., 2016. Plasma Desphospho-Uncarboxylated Matrix Gla Protein as a Marker of Kidney Damage and Cardiovascular Risk in Advanced Stage of Chronic Kidney Disease. *Kidney Blood Press. Res.* 41, 231–239. <https://doi.org/10.1159/000443426>
- London G.M., Guérin A.P., Marchais S.J., Métivier F., Pannier B., Adda H., 2003. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 18, 1731–1740.
- Luo G., Ducey P., McKee M.D., Pinero G.J., Loyer E., Behringer R.R., Karsenty G., 1997. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386, 78–81. <https://doi.org/10.1038/386078a0>
- Mallet G., 2017. Etude prospective et rétrospective des intoxications aux rodenticides anticoagulants chez le chien à l'aide des données du CNITV. Université Claude Bernard, Lyon 1.
- McCabe K.M., Booth S.L., Fu X., Ward E., Adams M.A., Holden R.M., 2017. Vitamin K Metabolism in a Rat Model of Chronic Kidney Disease. *Am. J. Nephrol.* 45, 4–13. <https://doi.org/10.1159/000451068>

- Moe S.M., Chen N.X., 2004. Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Circ. Res.* 95, 560–567. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000141775.67189.98>
- Mueller R.L., Scheidt S., 1994. History of drugs for thrombotic disease. Discovery, development, and directions for the future. *Circulation* 89, 432–449. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.89.1.432>
- Murshed M., Schinke T., McKee M.D., Karsenty G., 2004. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J. Cell Biol.* 165, 625–630. <https://doi.org/10.1083/jcb.200402046>
- National Research Council, Division on Earth and Life Studies, Board on Agriculture and Natural Resources, Committee on Animal Nutrition, Subcommittee on Dog and Cat Nutrition, 2006. *Nutrient Requirements of Dogs and Cats*. National Academies Press.
- National Research Council, Division on Earth and Life Studies, Board on Agriculture and Natural Resources, Committee on Animal Nutrition, Subcommittee on Dog and Cat Nutrition N.R., 2001. *Nutrient Requirements of Dogs*. <https://doi.org/10.17226/20184>
- Nayak-Rao S., Shenoy M.P., 2017. Stroke in Patients with Chronic Kidney Disease...: How do we Approach and Manage it? *Indian J. Nephrol.* 27, 167–171. <https://doi.org/10.4103/0971-4065.202405>
- Ogawa T., Nitta K., 2018. Pathogenesis and Management of Vascular Calcification in Patients with End-Stage Renal Disease. *Contrib. Nephrol.* 196, 71–77. <https://doi.org/10.1159/000485702>
- Okano T., Shimomura Y., Yamane M., Suhara Y., Kamao M., Sugiura M., Nakagawa K., 2008. Conversion of Phylloquinone (Vitamin K1) into Menaquinone-4 (Vitamin K2) in Mice : two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of Mice. *J. Biol. Chem.* 283, 11270–11279. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702971200>
- Price P.A., Faus S.A., Williamson M.K., 2000. Warfarin-Induced Artery Calcification Is Accelerated by Growth and Vitamin D. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 317–327. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.2.317>
- Price P.A., Rice J.S., Williamson M.K., 1994. Conserved phosphorylation of serines in the Ser-X-Glu/Ser(P) sequences of the vitamin K-dependent matrix Gla protein from shark, lamb, rat, cow, and human. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 3, 822–830.
- Proudfoot D., Skepper J.N., Hegyi L., Bennett M.R., Shanahan C.M., Weissberg P.L., 2000. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ. Res.* 87, 1055–1062.
- Puzantian H., Akers S.R., Oldland G., Javaid K., Miller R., Ge Y., Ansari B., Lee J., Suri A., Hasmath Z., Townsend R., Chirinos J.A., 2018. Circulating dp-ucMGP is Associated with Kidney Dysfunction and Arterial Stiffness. *Am. J. Hypertens.* <https://doi.org/10.1093/ajh/hpy079>
- Qiao J.-H., Mertens R.B., Fishbein M.C., Geller S.A., 2003. Cartilaginous metaplasia in calcified diabetic peripheral vascular disease: morphologic evidence of enchondral ossification. *Hum. Pathol.* 34, 402–407. <https://doi.org/10.1053/hupa.2003.72>
- Reinecke H., Brand E., Mesters R., Schäbitz W.-R., Fisher M., Pavenstädt H., Breithardt G., 2009. Dilemmas in the management of atrial fibrillation in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20, 705–711. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007111207>
- Rennenberg R.J.M.W., Kessels A.G.H., Schurgers L.J., van Engelshoven J.M.A., de Leeuw P.W., Kroon A.A., 2009. Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: A meta-analysis. *Vasc. Health Risk Manag.* 5, 185–197.
- Roche M., 2008. Intoxications par les rodenticides antivoagulants chez les animaux : Synthèse bibliographique et réalisation d'un guide vétérinaire sur la prise en charge des animaux intoxiqués par les anticoagulants, à l'usage des professions médicales.pdf. Université Claude Bernard, Lyon 1.

- Sage A.P., Tintut Y., Demer L.L., 2010. Regulatory Mechanisms in Atherosclerotic Calcification. *Nat. Rev. Cardiol.* 7, 528–536. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.115>
- Sanderson S.L., n.d. Nutritional Requirements and Related Diseases of Small Animals - Management and Nutrition [WWW Document]. Merck Vet. Man. URL <https://www.merckvetmanual.com/management-and-nutrition/nutrition-small-animals/nutritional-requirements-and-related-diseases-of-small-animals> (accessed 8.7.18).
- Saran R., Robinson B., Abbott K.C., Agodoa L.Y.C., Bhavane N., Bragg-Gresham J., Balkrishnan R., Dietrich X., Eckard A., Eggers P.W., Gaipov A., Gillen D., Gipson D., Hailpern S.M., Hall Y.N., Han Y., He K., Herman W., Heung M., Hirth R.A., Hutton D., Jacobsen S.J., Jin Y., Kalantar-Zadeh K., Kapke A., Kovesdy C.P., Lavalley D., Leslie J., McCullough K., Modi Z., Molnar M.Z., Montez-Rath M., Moradi H., Morgenstern H., Mukhopadhyay P., Nallamothu B., Nguyen D.V., Norris K.C., O'Hare A.M., Obi Y., Park C., Pearson J., Pisoni R., Potukuchi P.K., Rao P., Repeck K., Rhee C.M., Schragger J., Schaubel D.E., Selewski D.T., Shaw S.F., Shi J.M., Shieu M., Sim J.J., Soohoo M., Steffick D., Streja E., Sumida K., Tamura M.K., Tilea A., Tong L., Wang D., Wang M., Woodside K.J., Xin X., Yin M., You A.S., Zhou H., Shahinian V., 2018. US Renal Data System 2017 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am. J. Kidney Dis.* 71, A7. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2018.01.002>
- Scheiber D., Veulemans V., Horn P., Chatrou M.L., Potthoff S.A., Kelm M., Schurgers L.J., Westenfeld R., 2015. High-Dose Menaquinone-7 Supplementation Reduces Cardiovascular Calcification in a Murine Model of Extrasosseous Calcification. *Nutrients* 7, 6991–7011. <https://doi.org/10.3390/nu7085318>
- Schlieper G., Schurgers L., Brandenburg V., Reutelingsperger C., Floege J., 2016. Vascular calcification in chronic kidney disease: an update. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 31, 31–39. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv111>
- Schurgers L., Cranenburg E., Vermeer C., 2008. Matrix Gla-protein: The calcification inhibitor in need of vitamin K. <https://doi.org/10.1160/TH08-02-0087>
- Schurgers L.J., Barreto D.V., Barreto F.C., Liabeuf S., Renard C., Magdeleyns E.J., Vermeer C., Choukroun G., Massy Z.A., 2010. The Circulating Inactive Form of Matrix Gla Protein Is a Surrogate Marker for Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: A Preliminary Report. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 5, 568–575. <https://doi.org/10.2215/CJN.07081009>
- Schurgers L.J., Geleijnse J.M., Grobbee D.E., Pols H.A.P., Hofman A., Witteman J.C.M., Vermeer C., 1999. Nutritional Intake of Vitamins K1 (Phylloquinone) and K2 (Menaquinone) in The Netherlands. *J. Nutr. Environ. Med.* 9, 115–122. <https://doi.org/10.1080/13590849961717>
- Schurgers L.J., Teunissen K.J.F., Knapen M.H.J., Kwaijtaal M., Diest R. van, Appels A., Reutelingsperger C.P., Cleutjens J.P.M., Vermeer C., 2005. Novel Conformation-Specific Antibodies Against Matrix γ -Carboxyglutamic Acid (Gla) Protein: Undercarboxylated Matrix Gla Protein as Marker for Vascular Calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1629–1633. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000173313.46222.43>
- Schurgers L.J., Vermeer C., 2000. Determination of phylloquinone and menaquinones in food. Effect of food matrix on circulating vitamin K concentrations. *Haemostasis* 30, 298–307. <https://doi.org/10.1159/000054147>
- Shearer M.J., 2009. Vitamin K in Parenteral Nutrition. *Gastroenterology* 137, S105–S118. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.08.046>

- Shearer M.J., Newman P., 2008. Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thromb. Haemost.* 100, 530–547.
- Shiraki M., 2015. Health benefits and demerits of calcium nutrition or supplementation in older people. *Nihon Rinsho Jpn. J. Clin. Med.* 73, 1770–1776.
- Stafford D.W., n.d. The vitamin K cycle. *J. Thromb. Haemost.* 3, 1873–1878. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01419.x>
- Sweatt A., Sane D.C., Hutson S.M., Wallin R., 2003. Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats. *J. Thromb. Haemost.* JTH 1, 178–185.
- Thamratnookoon S., Susantitaphong P., Tumkosit M., Katavetin P., Tiranathanagul K., Praditpornsilpa K., Eiam-Ong S., 2017. Correlations of Plasma Desphosphorylated Uncarboxylated Matrix Gla Protein with Vascular Calcification and Vascular Stiffness in Chronic Kidney Disease. *Nephron* 135, 167–172. <https://doi.org/10.1159/000453368>
- Thane C.W., Bolton-Smith C., Coward W.A., 2006. Comparative dietary intake and sources of phylloquinone (vitamin K1) among British adults in 1986–7 and 2000–1. *Br. J. Nutr.* 96, 1105–1115. <https://doi.org/10.1017/BJN20061971>
- Thane C.W., Paul A.A., Bates C.J., Bolton-Smith C., Prentice A., Shearer M.J., 2002. Intake and sources of phylloquinone (vitamin K1): variation with socio-demographic and lifestyle factors in a national sample of British elderly people. *Br. J. Nutr.* 87, 605–613. <https://doi.org/10.1079/BJN2002583>
- Torii S., Ikari Y., Tanabe K., Kakuta T., Hatori M., Shioi A., Okano T., 2016. Plasma phylloquinone, menaquinone-4 and menaquinone-7 levels and coronary artery calcification. *J. Nutr. Sci.* 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.20>
- Tsai M.-T., Chen Y.-Y., Chang W.-J., Li S.-Y., 2018. Warfarin accelerated vascular calcification and worsened cardiac dysfunction in remnant kidney mice. *J. Chin. Med. Assoc. JCMSA* 81, 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.08.021>
- Verbeke F., Van Biesen W., Honkanen E., Wikström B., Jensen P.B., Krzesinski J.-M., Rasmussen M., Vanholder R., Rensma P.L., 2011. Prognostic Value of Aortic Stiffness and Calcification for Cardiovascular Events and Mortality in Dialysis Patients: Outcome of the Calcification Outcome in Renal Disease (CORD) Study. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 6, 153–159. <https://doi.org/10.2215/CJN.05120610>
- Wajih N., Borrás T., Xue W., Hutson S.M., Wallin R., 2004. Processing and Transport of Matrix γ -Carboxyglutamic Acid Protein and Bone Morphogenetic Protein-2 in Cultured Human Vascular Smooth Muscle Cells: evidence for an uptake mechanism for serum fetuin. *J. Biol. Chem.* 279, 43052–43060. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407180200>
- Walther B., Karl J.P., Booth S.L., Boyaval P., 2013. Menaquinones, Bacteria, and the Food Supply: The Relevance of Dairy and Fermented Food Products to Vitamin K Requirements. *Adv. Nutr.* 4, 463–473. <https://doi.org/10.3945/an.113.003855>
- Witzenbichler B., 2011. [Anticoagulant therapy for chronic cardiac diseases. Atrial fibrillation, valvular heart disease, congestive heart failure]. *Internist* 52, 1301–1302, 1304–1306, 1308–1309. <https://doi.org/10.1007/s00108-011-2838-z>
- Wu M., Rementer C., Giachelli C.M., 2013. Vascular Calcification: an Update on Mechanisms and Challenges in Treatment. *Calcif. Tissue Int.* 93, 365–373. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9712-z>
- Zoch M.L., Clemens T.L., Riddle R.C., 2016. New Insights into the Biology of Osteocalcin. *Bone* 82, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.046>

GILLET Romain

**PRODUCTION D'UN STANDARD ANALYTIQUE DE DPUC-MGP
CANINE EN VUE DE LA MISE EN PLACE D'UNE METHODE DE
DOSAGE DE CETTE PROTEINE**

Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Lyon, le 30 Octobre 2018

RESUME :

Chez l'Homme et le Rat, l'insuffisance rénale chronique est associée à une augmentation de la calcification vasculaire et à un déficit en vitamine K fonctionnelle. Le dosage de la dpucMGP plasmatique est un outil intéressant d'exploration de la calcification vasculaire et de l'insuffisance rénale chronique chez ces deux espèces.

L'insuffisance rénale chronique étant une maladie fréquente chez le Chien, notre travail a eu pour objectif de développer un standard analytique de la dpucMGP plasmatique canine, afin d'apporter un outil supplémentaire dans l'exploration et l'étude de cette maladie, et de la calcification artérielle qui pourrait y être associée.

Pour ce faire, nous avons choisi la synthèse et la purification d'une protéine recombinante par E. coli avec le plasmide pET28b(+). La dMGP synthétisée est parfaitement reconnue par des anticorps anti dpucMGP humaine, ce qui permet d'envisager le recours à un dosage immunologique de la dpucMGP humaine pour le dosage de la dpucMGP plasmatique canine : il devient ainsi possible d'évaluer la pertinence de ce paramètre biologique en tant que marqueur de la calcification chez le Chien atteint d'insuffisance rénale.

MOTS CLES :

- Analyse quantitative
- Protéines vitamine K-dépendantes
- Vitamine K
- Chien
- Calcification

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur François MION
1er Assesseur :	Monsieur le Professeur Etienne BENOIT
2ème Assesseur :	Madame le Docteur Emilie KRAFFT
Invité :	Madame le Docteur Virginie LATTARD

DATE DE SOUTENANCE : 30 Octobre 2018