



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/  
Eprints ID : 17909](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 17909)

**To cite this version :**

Forge, Laurine. *Évaluation expérimentale des conséquences de l'immunisation contre Escherichia coli dans la protection vis-a-vis des mammites : Effet de la voie d'administration*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 138 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

# ÉVALUATION EXPÉRIMENTALE DES CONSÉQUENCES DE L'IMMUNISATION CONTRE *ESCHERICHIA COLI* DANS LA PROTECTION VIS-A-VIS DES MAMMITES : EFFET DE LA VOIE D'ADMINISTRATION

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**FORGE Laurine**

Née, le 17/10/1990 à RILLIEUX-LA-PAPE (69)

**Directeur de thèse : M. Gilles FOUCRAS**

## JURY

PRESIDENT :

**M. Éric OSWALD**

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**M. Gilles FOUCRAS**

**M. Dominique BERGONIER**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

**M. Vincent HERRY**

Résident à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



*Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.*

Mise à jour : 06/09/2016

**DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN**

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p><b>Responsable : M. SANS</b></p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>ÉPIDÉMIOLOGIE :</u> Mme Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>MALADIES RÉGLEMENTÉES-ZOOZOSES- MÉDECINE PRÉVENTIVE DES CARNIVORES DOMESTIQUES-DROIT VÉTÉRINAIRE :</u> M. PICAVET Dominique, PR</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIÈNE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGÈRE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIÈRE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, MC M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVAIRE ET PORCINE :</u> Mme WAR ET-SKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES</u> <u>AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE ÉCONOME :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p><b>Responsable : Mme GAYRARD</b></p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNÈREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, MC Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR</p> <p><u>BIOLOGIE MOLÉCULAIRE :</u> Mme BOUCLAIVILLE-CAMU S Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Hélène, MC</p> <p><u>BIostatistiques :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUWY Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE - PHARMACOLOGIE THÉRAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p><b>Responsable : Mme CADIERGUES</b></p> <p><u>ANESTHÉSIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MÉDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MÉDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLÉCULAIRE :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES ÉQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme PRADIER Sophie, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>



## **REMERCIEMENTS**

A notre président de thèse,

### **A Monsieur le professeur Eric OSWALD**

*Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE*

*Bactériologie et Hygiène*

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Veillez trouver ici l'expression de nos respectueux hommages.

A notre jury de thèse,

### **A Monsieur le Professeur Gilles FOUCRAS**

*Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE*

*Pathologies des ruminants*

Qui nous a fait l'honneur de nous confier ce projet et nous a soutenu tout au long de son élaboration

Veillez accepter l'expression de mon entière reconnaissance et remerciements.

### **A Monsieur le Docteur Dominique BERGONIER**

*Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE*

*Pathologie de la reproduction*

Qui nous a fait l'honneur de faire partie de notre jury de thèse,

Nos plus sincères remerciements.

**A Monsieur le Docteur Vincent Herry**

*Résident*

*Pathologie des ruminants*

Qui m'a aidée et soutenue au cours de la réalisation de ce travail,

Ma plus sincère reconnaissance.

**A Messieurs les docteurs Pascal RAINARD et Pierre GERMON**

*Infectiologie et santé publique de l'INRA de Tours*

Pour avoir rendu cette étude possible.

**A toute l'équipe de l'Equipe Immunologie de l'INRA de Toulouse et de la PFIE de l'INRA de Tours**

Pour leur disponibilité et leur gentillesse.

## **TABLE DES MATIERES**

INTRODUCTION.....	13
Partie 1 : Etude bibliographique.....	15
<b>1. Description épidémiologique-clinique des mammites à <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>15</b>
1.1 Définition clinique des mammites à <i>Escherichia coli</i> .....	15
1.1.1 Mammite subclinique.....	15
1.1.2. Mammite clinique.....	15
❖ Signes locaux.....	16
❖ Signes systémiques.....	17
1.2 Diagnostic de laboratoire.....	21
1.3 Classification.....	22
<b>2. Epidémiologie.....</b>	<b>25</b>
2.1. Epidémiologie descriptive.....	25
2.1.1. Incidence et prévalence .....	25
2.1.2. Saisonnalité .....	27
2.2. Epidémiologie analytique.....	29
2.2.1. Facteurs liés à l'agent .....	29
2.2.1.1. Etiologie de l'infection.....	29
❖ Les adhésines.....	29
❖ Les capsules.....	30
❖ La membrane cellulaire .....	30
❖ Le lipopolysaccharide ou LPS.....	30
2.2.1.2. Facteurs de virulence.....	32
❖ Échappement aux défenses immunitaires.....	32
❖ Sensibilité au sérum.....	33
❖ Production d'endotoxines.....	34
2.2.2. Facteurs liés à l'hôte.....	35
2.2.2.1. Âge .....	35
2.2.2.2. Stade de lactation.....	35
2.2.2.3. Génétique.....	38
2.2.3. Facteurs environnementaux.....	39
2.2.3.1. Logement.....	39
2.2.3.2. Rationnement.....	40
<b>3. Physiopathologie des mammites à <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>41</b>
3.1. Infection et colonisation de la glande mammaire.....	41
3.1.1. Passage à travers le sphincter .....	41



3.1.3. Adhésion et colonisation .....	43
3.1.4. Persistance .....	44
3.2. Réponse de l'hôte .....	46
3.2.1. Mécanismes physiques de défense .....	46
3.2.2. Mécanisme de défense immunitaire .....	47
3.2.2.1. Immunité innée .....	47
❖ Immunité cellulaire .....	48
▪ Détecteurs de MAMPS : TLR et NOD .....	48
▪ Les granulocytes neutrophiles (GNN) .....	51
▪ Les macrophages .....	53
▪ Les cellules Natural Killer (NK) .....	54
▪ Les cellules épithéliales .....	54
❖ Immunité humorale .....	54
▪ Les peptides antimicrobiens (AMPs) .....	54
➤ La lactoferrine .....	54
➤ La transferrine .....	57
➤ Les défensines .....	57
➤ Les cathélicidines .....	57
▪ Le système du complément .....	57
▪ Les anticorps naturels .....	59
▪ Les protéines de la phase aiguë .....	60
▪ Les composants chimiques .....	60
3.2.2.2. Immunité acquise .....	61
❖ Les lymphocytes .....	61
▪ Les lymphocytes T .....	62
▪ Les lymphocytes B et les immunoglobulines .....	63
▪ Le rôle des cytokines .....	64
➤ Les interleukines (IL) .....	64
➤ Les interférons ( IFN) .....	65
➤ Les TNF (tumor necrosis factor) .....	65
3.2.2.3. Lien entre LPS, TLR et NO .....	66
3.2.2.4. La perméabilité de la mamelle .....	66
<b>4. Traitement et mesures préventives .....</b>	<b>68</b>
4.1. Traitement curatif .....	68
4.1.1. Traitement antibiotique .....	68
4.1.1.1. Principes généraux .....	68

4.1.1.2. Applications.....	69
4.1.2. Résistance aux antibiotiques.....	71
4.1.3. Traitement complémentaire.....	73
4.1.4. Prévention et mesures d'hygiène.....	74
4.2. Traitement préventif des infections de la période sèche.....	75
4.3. Vaccination.....	76
4.3.1. Moyens, vaccins disponibles .....	76
4.3.2. Résultats attendus .....	77
Partie 2 : Etude expérimentale.....	79
<b>1. Matériels et méthodes .....</b>	<b>80</b>
1.1. Lieu de l'expérience.....	80
1.2. Les animaux .....	81
❖ Synchronisation des chaleurs .....	82
❖ Critères d'éligibilité pour l'infection mammaire.....	83
❖ Répartition des vaches.....	84
1.3. L'immunisation .....	85
1.4. Epreuve bactérienne .....	87
1.5. Score et examen clinique.....	88
❖ Etat général.....	89
❖ Mamelle et lait.....	90
1.6. Prélèvement d'échantillons .....	90
❖ Lait .....	93
❖ Sang.....	93
1.7. Production de lait, comptage des cellules somatiques.....	95
1.8. Comptage bactérien et durée de l'infection mammaire.....	95
1.9. Analyse statistique.....	95
<b>2. Résultats .....</b>	<b>96</b>
2.1. Signes cliniques systémiques et température ruminale .....	96
2.2. Signes locaux et production laitière .....	99
2.3. Concentration bactérienne et durée de l'infection.....	103
2.4. Concentration des cellules somatiques, CCS et caractérisation des types cellulaires dans le lait.....	105
2.5. Leucocytes sanguins.....	108
2.6. Protéines de la phase aiguë.....	112
Partie 3 : Discussion.....	115
<b>1. Signes cliniques et production laitière .....</b>	<b>115</b>
<b>2. Clairance bactérienne et durée de l'infection .....</b>	<b>116</b>

<b>3. CCS, lymphocytes et neutrophiles dans le lait .....</b>	<b>116</b>
3.1. La vaccination et la réponse anticorps.....	117
3.2. La vaccination et la mise en place d'une réponse cellulaire.....	117
<b>4. Protéines de la phase aiguë .....</b>	<b>119</b>
<b>5. Choix de la voie d'administration .....</b>	<b>119</b>
<b>6. Choix du calendrier vaccinal.....</b>	<b>120</b>
<b>7. Choix des primipares .....</b>	<b>121</b>
<b>8. Choix de la souche utilisée lors de l'inoculation intra-mammaire .....</b>	<b>122</b>
CONCLUSION .....	123
BIBLIOGRAPHIE .....	124
ANNEXES .....	137

## **LISTE DES FIGURES**

<i>Figure 1 : Score des signes cliniques locaux lors de deux inoculations d'E. coli successives.</i>	17
<i>Figure 2 : Score des signes cliniques généraux lors de deux inoculations d'E. coli successives.</i>	18
<i>Figure 3 : Température rectale (a), fréquence cardiaque (b) et fréquence respiratoire (c) (Vangroenweghe et al, 2004).</i>	20
<i>Figure 4: Pourcentages des différents germes isolés lors de mammites cliniques (Bergonier, 2013).</i>	26
<i>Figure 5: Nombre d'infections intra-mammaires dues aux bactéries à Gram négatif durant les différentes saisons de l'année (Todhunter et al, 1991).</i>	28
<i>Figure 6 : Structure générale d'un lipopolysaccharide.</i>	32
<i>Figure 7: Nombre d'infections mammaires causées par E. coli et par Klebsiella spp, (Todhunter et al, 1991).</i>	36
<i>Figure 8 : Viabilité des neutrophiles du lait et du sang en début, milieu et fin de lactation chez les vaches laitières (Mehrzaad et al, 2001).</i>	38
<i>Figure 9 : Représentation simplifiée des principales voies de signalisation en aval des TLR, (Tadeka et al, 2008).</i>	50
<i>Figure 10 : La neutralisation du LPS par la lactoferrine.</i>	56
<i>Figure 11 : Voie classique d'activation du complément (Williams, 2012).</i>	58
<i>Figure 12 : Voie alterne d'activation du complément (Williams, 2012).</i>	59
<i>Figure 13 : Voie des lectines pour l'activation du complément (Williams, 2012).</i>	59
<i>Figure 14 : Evolution de la température rectale lors de mammites expérimentales à E. coli (Poutrel, 2008).</i>	70
<i>Figure 15 : Evolution de la production laitière, ml lors de mammites expérimentales à E. coli (Poutrel, 2008).</i>	70
<i>Figure 16 : Interaction des bactéries responsables de mammite avec le système immunitaire de l'hôte (Rainard, 2015).</i>	77
<i>Figure 17 : Stabulation de la PFIE de l'INRA de Tours</i>	80

<i>Figure 18 : Salle de traite de la PFIE de l'INRA de Tours .....</i>	<i>81</i>
<i>Figure 19 : Contention de la vache lors de l'immunisation intra-mammaire .....</i>	<i>86</i>
<i>Figure 20 : Capture d'écran lors de la vidéo de l'inoculation bactérienne d'une vache.....</i>	<i>88</i>
<i>Figure 21 : Prélèvements réalisés avant l'inoculation bactérienne .....</i>	<i>91</i>
<i>Figure 22 : Prélèvements réalisés après l'inoculation bactérienne .....</i>	<i>92</i>
<i>Figure 23 : Moyennes des scores cliniques des signes généraux suite à une épreuve intra-mammaire avec E. coli P4 à 0h.....</i>	<i>96</i>
<i>Figure 24 : Moyennes de la température intraruminale suite à une épreuve intra-mammaire avec E. coli P4 à 0h.....</i>	<i>97</i>
<i>Figure 25 : Moyennes des scores cliniques généraux cumulés sur les 80 premières heures suite à une épreuve intra-mammaire avec E. coli P4.....</i>	<i>98</i>
<i>Figure 26 : Moyennes des scores cliniques des signes locaux suite à une épreuve intra-mammaire avec E. coli P4 à 0h.....</i>	<i>99</i>
<i>Figure 27 : Moyennes des scores cliniques locaux cumulés sur les 80 premières heures suite à une épreuve intra-mammaire avec E. coli P4.....</i>	<i>100</i>
<i>Figure 28 : Moyennes de la production laitière journalière, pourcentage de la production laitière de référence suite à une épreuve intra-mammaire avec E. coli P4 à 0h.....</i>	<i>101</i>
<i>Figure 29 : Production laitière du jour 1 au jour 6 suite à une épreuve intra-mammaire avec E. coli P4.....</i>	<i>102</i>
<i>Figure 30 : Moyennes des unités formant colonies (UFC) suite à une épreuve intra-mammaire avec E. coli P4 à 0h.....</i>	<i>103</i>
<i>Figure 31 : Durée moyenne de l'infection mammaire suite à une épreuve intra-mammaire avec E. coli P4 .....</i>	<i>104</i>
<i>Figure 32 : Moyennes des comptages des cellules somatiques du lait suite à une épreuve intra-mammaire avec E. coli P4 à 0h .....</i>	<i>105</i>
<i>Figure 33 : Moyennes de la concentration des lymphocytes dans le lait suite à une épreuve intra-mammaire avec E. coli P4 à 0h .....</i>	<i>106</i>
<i>Figure 34 : Moyennes de la concentration des PMN vivants dans le lait suite à une épreuve intra-mammaire avec E. coli P4 à 0h .....</i>	<i>107</i>

*Figure 35 : Moyennes de la concentration des leucocytes sanguins suite à une épreuve intra-mammaire avec E. coli P4 à 0h..... 108*

*Figure 36 : Moyennes de la concentration des lymphocytes T sanguins suite à une épreuve intra-mammaire avec E. coli P4 à 0h. .... 109*

*Figure 37 : Moyennes de la concentration des PMN sanguins suite à une épreuve intra-mammaire avec E. coli P4 à 0h ..... 110*

*Figure 38 : Moyennes de la concentration des monocytes sanguins suite à une épreuve intra-mammaire avec E. coli P4 à 0h..... 111*

*Figure 39 : Moyennes de la concentration plasmatique de l'haptoglobine suite à une épreuve intra-mammaire avec E. coli P4 à 0h ..... 112*

*Figure 40 : Moyennes de la concentration plasmatique de la SAA suite à une épreuve intra-mammaire avec E. coli P4 à 0h..... 113*

## **LISTE DES TABLEAUX**

<i>Tableau 1 : Système de classification de la sévérité des mammites coliformes cliniques chez les vaches laitières basé sur les signes cliniques systémiques (Wenz, 2006).</i>	23
<i>Tableau 2 : Bilan des scores cliniques basés sur les signes cliniques systémiques (Wenz, 2006).</i>	23
<i>Tableau 3: Système de classification de la sévérité des mammites coliformes cliniques chez les vaches laitières basé sur les signes cliniques locaux (Wenz, 2006).</i>	24
<i>Tableau 4: Bilan des scores cliniques basés sur les signes cliniques locaux (Wenz, 2006).</i>	24
<i>Tableau 5 : Prévalence des mammites cliniques à E. coli selon le pays (Bulletin des GTV, 2010).</i>	26
<i>Tableau 6 : Prévalence des agents pathogènes (N=362) impliqués en France dans les mammites aiguës (Poutrel, 2008).</i>	27
<i>Tableau 7: Héritabilité du score cellulaire moyen par lactation (SCSL) et des mammites cliniques (MC) et corrélations génétiques avec les caractères de production laitière, la morphologie de la mamelle et la vitesse de traite (Rupp et Boichard, 2001).</i>	39
<i>Tableau 8 : Récapitulatif des PRR et de leurs principaux ligands (Werling et al, 2007 ; Chang et al, 2009 ; Jungi et al, 2010).</i>	49
<i>Tableau 9 : Concentration des différentes immunoglobulines dans le lait (Buter et al, 1981)</i>	60
<i>Tableau 10 : Type cellulaire selon la santé de la mamelle (Asai et al, 1998).</i>	62
<i>Tableau 11 : Rapport CD4/CD8 dans le lait d'une mamelle selon les différents stades physiologiques (Asai et al, 1998).</i>	62
<i>Tableau 12 : Bilan des pourcentages de résistance de certains antibiotiques lors de mammites à E. coli obtenus dans quatre études.</i>	72
<i>Tableau 13 : Prévalence des différents agents pathogènes par quartier chez les vaches présentant une infection mammaire au vêlage (Berry et al, 2002).</i>	75
<i>Tableau 14 : Numéros de travail des génisses accueillies à la PFIE</i>	81
<i>Tableau 15 : Calendrier des différents traitements pour la synchronisation des chaleurs</i>	82
<i>Tableau 16 : Répartition des vaches dans les différentes vagues</i>	84
<i>Tableau 17 : Composition définitive des différents vagues et lots expérimentaux</i>	84

<i>Tableau 18 : Calendrier de l'immunisation des vaches.....</i>	<i>87</i>
<i>Tableau 19 : Date de vêlage et du challenge bactérien des vaches.....</i>	<i>88</i>
<i>Tableau 20 : Différents types d'analyse du lait .....</i>	<i>93</i>
<i>Tableau 21 : Différents types d'analyse du sang .....</i>	<i>94</i>



## **LISTE DES ANNEXES**

<i>Annexe 1 : Présentation d'un extrait de la feuille de renseignement concernant l'examen de la mamelle et du lait .....</i>	<i>137</i>
---	------------

## INTRODUCTION

Les bactéries à Gram négatif sont les agents pathogènes les plus souvent isolés lors de mammites cliniques aiguës. L'expression « mammite coliforme » est souvent incorrectement utilisée pour désigner une infection mammaire causée par toutes les bactéries à Gram négatif. Les genres bactériens classifiés en tant que coliformes sont *Escherichia*, *Klebsiella* et *Enterobacter* alors que le terme colibacillaire désigne quant à lui toute infection causée par la bactérie *Escherichia coli* seulement. Les bactéries à Gram négatif sont considérées comme des agents de mammites d'origine environnementale. En effet, la contamination bactérienne de la glande mammaire est possible par une exposition permanente à un environnement dans lequel la quantité de germes est très grande.

*E. coli* est souvent impliquée dans l'infection et l'inflammation de la mamelle chez les vaches laitières, particulièrement en peri-partum et en début de lactation avec des signes cliniques locaux voire généraux pouvant être sévères. Cet agent pathogène peut aussi affecter la production laitière des vaches hautes productrices dans les élevages laitiers. Ainsi, ces mammites peuvent aboutir à une modification du lait, une baisse de la production laitière mais aussi à une altération de l'état clinique de la vache. Les cas les plus sévères de mammites colibacillaires peuvent aboutir à la mort de l'animal dans un délai relativement bref. Par conséquent, l'impact économique des mammites colibacillaires est loin d'être négligeable du fait du coût des traitements et de la perte de production. La mammite coliforme reste une maladie difficile à traiter en élevage laitier, la thérapie curative étant peu efficace à prévenir toutes les conséquences.

Différentes stratégies ont été mises en place pour la prévention des infections mammaires par *E. coli* telles que les mesures hygiéniques ou la vaccination qui fut développée dans les années 1980. Toutefois, les mécanismes d'action de la vaccination ne sont pas complètement définis et son efficacité reste médiocre.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une étude bibliographique de l'infection mammaire par *E. coli* chez la vache. Elle synthétise les différentes données sur la description clinique, les mécanismes physiopathologiques, dont la réponse immunitaire et les moyens de lutte associés à une infection mammaire par *E. coli*.

La deuxième partie de ce manuscrit aborde le travail expérimental avec une description des protocoles d'immunisation avec deux voies d'administration différentes. Ces

derniers permettent d'étudier les conséquences cliniques de l'infection induite expérimentalement chez la vache laitière primipare. Les résultats obtenus sont ensuite confrontés aux différentes connaissances en rapport avec ce sujet et discutés pour en extraire les principales conclusions.

## **Partie 1 : Etude bibliographique**

### **1. Description épidémio-clinique des mammites à *Escherichia coli***

#### 1.1 Définition clinique des mammites à *Escherichia coli*

Après pénétration de la bactérie dans la lumière de la glande mammaire à travers le sphincter et le canal du trayon, sa multiplication dans le lait peut conduire, en fonction de la qualité de la réponse de l'hôte à l'apparition de signes cliniques plus ou moins marqués et d'une mammite subclinique ou clinique.

##### 1.1.1 Mammite subclinique

Par définition, cette forme d'inflammation mammaire est dépourvue de signes cliniques. Elle est donc mise en évidence par une augmentation plus ou moins grande de la concentration des cellules somatiques (par opposition aux cellules bactériennes), et par la présence de bactéries dans le lait.

Leur diagnostic est difficile du fait de l'absence de symptômes. La bactérie *E. coli* provoque rarement ce genre de mammites, sauf en période sèche où des formes latentes d'infection peuvent s'établir (Bradley et al, 2000). Elles conduisent parfois à une mammite clinique sévère au moment du vêlage.

##### 1.1.2. Mammite clinique

L'infection mammaire par *E. coli* est le plus souvent associée à l'expression de signes cliniques marqués. Cette forme est caractérisée par la présence systématique de signes cliniques qu'ils soient uniquement locaux, ou bien parfois généraux. La majorité des mammites à *E. coli* s'accompagne de signes cliniques locaux. Toutefois, seulement 10% de ces cas expriment en même temps des signes généraux et une diminution marquée de la production laitière (Smith et al, 1985 ; Bradley et Green, 2000). Dans la plupart des cas, l'infection est éliminée spontanément en 6 à 10 jours.

Cependant, il existe des cas sévères où *E. coli* provoque une mammite suraiguë. Ils sont parfois associés à une bactériémie. Les signes cliniques sont alors sévères à très sévères : l'animal, en état de choc décompensé, peut se retrouver en décubitus, incapable de se relever ; il est normotherme ou assez souvent en hypothermie. L'évolution vers la mort peut être rapide.

#### ❖ Signes locaux

Les signes locaux peuvent concerner la mamelle et le lait. Les différents signes de l'inflammation tels que le gonflement et l'œdème, la congestion (couleur rouge), la chaleur et la douleur à la palpation ou au moment de la traite. Concernant le lait, il contient des grumeaux ou des flammèches fibrineuses. Son aspect est modifié et prend l'aspect d'un liquide séreux voire être purulent. Il est important de noter que les signes locaux peuvent apparaître après les signes généraux.

Une étude menée par Suojala et ses collaborateurs a recensé les signes cliniques, locaux et généraux chez six vaches après induction expérimentale d'une mammite par injection intramammaire de 1 500 UFC d'*E. coli*. La souche utilisée est FT238 et fut isolée lors d'une mammite clinique. Deux épreuves bactériennes ont été réalisées à 14 jours d'intervalle dans deux quartiers différents d'une même vache. Les signes cliniques ont été recensés durant six jours après l'inoculation. Cette équipe a défini un score pour évaluer l'évolution clinique de la mamelle et du lait compris entre 1 (normal) à 3 (sévérement modifié). Les signes locaux sont apparus dans les 12h suivant l'inoculation, et ils étaient encore présents six jours après la première inoculation bactérienne ; à l'inverse, ils ont disparu 60 heures après la deuxième injection. Les signes locaux ont été significativement moins sévères au moment de la deuxième inoculation que lors de la première.

## Local signs

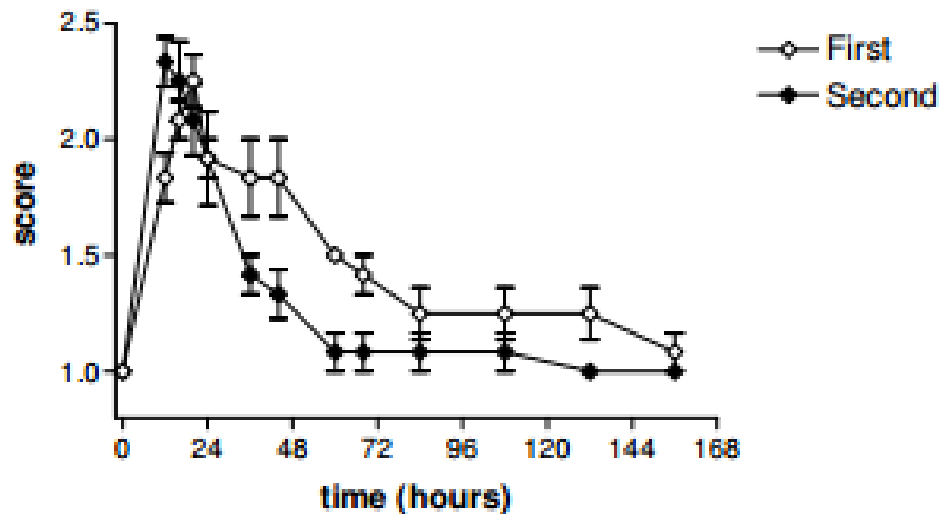


Figure 1 : Score des signes cliniques locaux lors de deux inoculations d'E. coli successives.

Les signes cliniques locaux suite aux deux inoculations intra-mammaires avec E. coli, séparées de deux semaines. Les valeurs sont des moyennes des scores cliniques obtenus chez six vaches. Les barres verticales représentent les écart-types (Suojala et al, 2008).

### ❖ Signes systémiques

Les signes généraux sont principalement de l'abattement, de l'hyperthermie, de la déshydratation, une anorexie, de la tachypnée et de la tachycardie, une atonie ruminale ou encore une chute de la production laitière (Wenz et al, 2001).

De nombreuses reproductions expérimentales des mammites cliniques ont été publiées ; elles décrivent l'intensité et la chronologie de ces différents symptômes. L'étude de Suojala détaillée précédemment a aussi étudié les signes généraux associés à la maladie. Les signes généraux qui ont été répertoriés sont la fréquence cardiaque, la température rectale, la motricité ruminale, l'appétit et l'état clinique. Ces différents points ont été notés sur une échelle allant de 1 (normal) à 3 (sévère). Les signes généraux apparaissent dans les 12 heures suivant l'inoculation. Ils étaient tous classés comme modérés, et disparaissaient 36 heures environ après l'inoculation dans les deux cas.

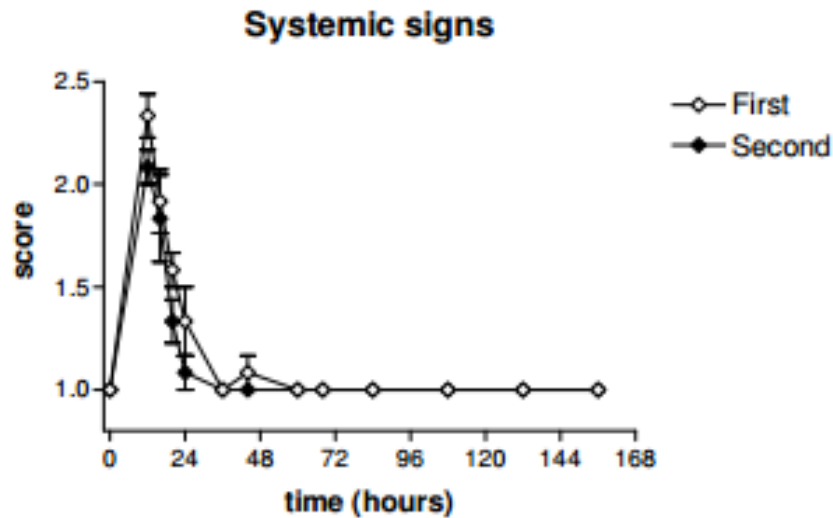
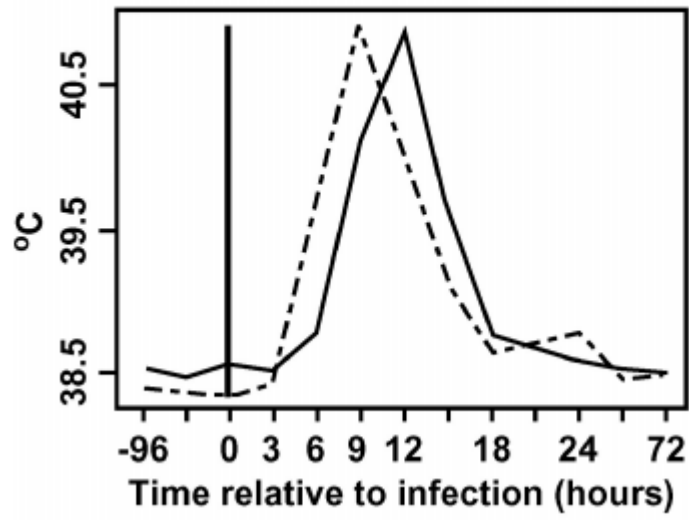


Figure 2 : Score des signes cliniques généraux lors de deux inoculations d'*E. coli* successives.

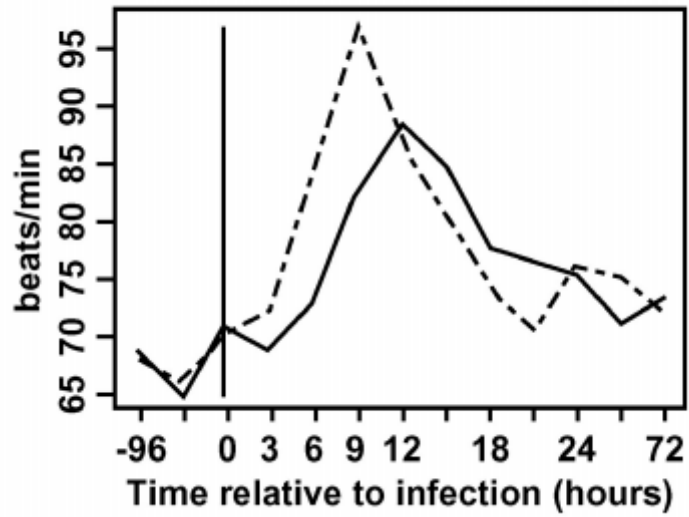
Les signes cliniques généraux suite aux deux inoculations intra-mammaires avec *E. coli*, séparées de deux semaines. Les valeurs sont des moyennes des scores cliniques obtenus chez six vaches. Les barres verticales représentent les écart-types (Suojala et al, 2008).

Vangroenweghe et son équipe ont étudié la réaction inflammatoire provoquée par l'inoculation de  $10^4$  à  $10^6$  UFC d'*E. coli* P4:O32 dans deux quartiers de 19 vaches primipares. Ils ont démontré que la production laitière avait diminué dans tous les quartiers, y compris ceux qui n'avaient pas été inoculés. Cette chute serait probablement la conséquence des effets systémiques de l'infection locale. Vingt-quatre heures après l'injection de bactéries, la température rectale, les fréquences cardiaque et respiratoire ont à nouveau les valeurs avant l'inoculation. Alors que la quantité de bactéries inoculées est grande, les vaches n'ont présenté que des signes cliniques modérés.

**a** Rectal temperature



**b** Heart rate





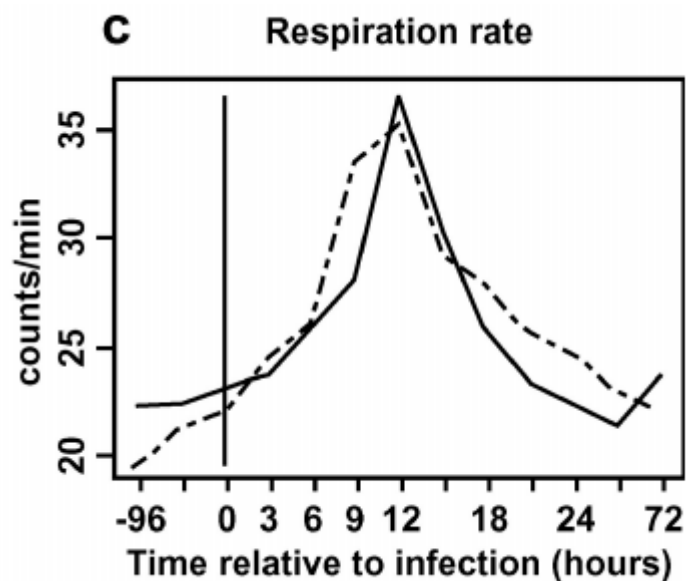


Figure 3 : Température rectale (a), fréquence cardiaque (b) et fréquence respiratoire (c) entre 96 heures avant l'inoculation bactérienne et 72 heures après l'inoculation bactérienne, respectivement, chez des vaches primipares ayant reçu  $1 \times 10^4$ , —; groupe A;  $n=9$  and  $1 \times 10^6$ , -----; groupe B;  $n = 10$  UFC de la souche P4:O32 d'*E. coli*. Les données sont des valeurs moyennes (Vangroenweghe et al, 2004).

Le diagnostic d'une mammite repose sur l'interprétation de ces différents signes cliniques ; il est cependant difficile d'affirmer qu'il s'agit d'une infection par *E. coli*, même si dans les cas sévères, la probabilité est assez élevée. Une étude menée par Hagiwara et son équipe a eu pour but d'identifier les signes cliniques prédictifs d'un mauvais pronostic chez les vaches avec une mammite clinique suraiguë due à *E. coli*. Parmi 24 vaches atteintes de mammites suraiguës dues à *E. coli* issues dans 17 élevages laitiers, 17 ont survécu alors que 7 sont mortes ou ont été euthanasiées. De nombreux paramètres ont été étudiés. Il a été montré que l'hyperthermie, la tachycardie, la tachypnée sont des signes qui ne permettent pas de distinguer les survivantes des vaches mortes ; ils ne peuvent donc pas être utilisés pour établir un pronostic ou prédire l'issue fatale chez ces vaches. Le décubitus, ou la difficulté à maintenir la station debout, sont eux des signes qui laissent présager un pronostic sombre pour l'animal.

## 1.2 Diagnostic de laboratoire

Le recours au laboratoire est nécessaire pour déterminer l'agent responsable de la mammité. Pour cela, un échantillon de lait doit être prélevé dans de bonnes conditions d'asepsie.

La culture bactériologique du lait reste la méthode de référence permettant l'identification de l'agent causal présent dans le lait. Cette méthode consiste à ensemencer 50 µL de lait sur une gélose au sang. Ce support est recommandé pour l'isolement lors de mammites. Étant donné qu'il s'agit d'un milieu nutritif non sélectif, il permet la croissance d'une large proportion des bactéries habituellement responsables de mammites. Parallèlement, il est possible d'incuber une fraction de l'échantillon dans un bouillon nutritif si la concentration bactérienne est trop faible pour être détectée directement. La lecture du résultat se fera entre 16 et 24h, les colibacilles apparaissant gris-jaunâtres et dégageant une odeur de fèces. Les résultats définitifs sont obtenus en 48 heures maximum. Dans la majorité des cas, une seule espèce bactérienne est identifiée. La croissance de deux espèces est rare, moins de 10%. Lors de l'identification de trois espèces ou plus sur la gélose, la question de la qualité de l'échantillon et de sa contamination au moment du prélèvement doit être posée.

Une gélose de Mac Conkey peut aussi être utilisée simultanément pour évaluer la quantité de germes. Sur cette gélose, les colonies d'*E. coli* sont roses ou rouges entourées d'une auréole rose. Certains laboratoires utilisent une gélose primaire d'isolement. Or, cette méthode présente 20 à 30% de faux négatifs. Dans ces cas, c'est probablement que le nombre de bactéries présents dans l'échantillon de lait est insuffisant. Afin d'éviter cet écueil, une quantité plus grande de lait peut être utilisée (jusqu'à 0,1 ml). Enfin pour la culture bactériologique, il est préférable d'utiliser du lait frais car la congélation diminue le nombre d'*E. coli* viables dans l'échantillon (Wallace, 2007).

D'autres supports existent pour l'isolement. Les plaques Petrifilm<sup>®</sup>, par exemple, sont constituées de milieux de culture sélectifs déshydratés permettant d'identifier *S.aureus*, *E. coli* et *Klebsiella*. Initialement utilisées dans l'industrie agro-alimentaire pour détecter les agents responsables de TIAC (Toxi-Infection Alimentaire Collective) son emploi a été détourné pour l'identification des agents causaux de mammites bovines tels que les staphylocoques ou les colibacilles. Lors de l'ajout du lait sur la gélose, les milieux sont réhydratés et permettent alors la croissance bactérienne. Les résultats sont disponibles après 22 à 24h d'incubation. Les colonies peuvent facilement être visualisées sur la gélose. Ces plaques présentent une sensibilité, spécificité, VPN (valeur prédictive négative) et VPP (valeur prédictive positive)

similaires à celles de la culture bactériologique au laboratoire (Kromber et al, 2007 ; McCarron et Keffe, 2008 ; Wallace et al, 2011). L'étude menée par McCarron a montré que la sensibilité et la spécificité de la méthode utilisant la gélose Petrifilm® étaient respectivement de 93,8% et 70,1%. Ainsi sa fiabilité, sa facilité d'utilisation, sa longue durée de conservation (1 an et demi) et son faible coût font de ce test une bonne alternative pour les vétérinaires praticiens et les éleveurs qui souhaitent réaliser la culture bactériologique pour le diagnostic étiologique des mammites.

L'identification de l'agent causal peut aussi être déterminée par l'utilisation de galeries commerciales miniaturisées. Il s'agit, par exemple, du Speed Mam Color® (Virbac) qui est un test diagnostique permettant l'identification des bactéries pathogènes responsables de mammites les plus fréquemment rencontrées et l'obtention rapide d'un antibiogramme. Il est composé de 14 puits pour déterminer la sensibilité de l'agent pathogène à différents antibiotiques, 8 puits pour identifier l'agent pathogène et 2 puits témoins. L'échantillon de lait est placé dans les différents puits, et placé à l'incubation à 37°C. La lecture est possible au bout de 24h pour le profil de sensibilité, et 48h pour l'identification de l'espèce. Il est cependant impossible de détecter une éventuelle contamination de l'échantillon avec ce test. En comparaison avec les méthodes traditionnelles de culture bactériologique, la sensibilité de ce test est de 92% et la spécificité de 96% (Manner, 2001).

### 1.3 Classification

La sensibilité de la vache laitière aux mammites à *E. coli* est évaluée à partir des symptômes qu'elle exprime. La sévérité des signes cliniques lors de mammite colibacillaire aiguë est le reflet de l'intensité des troubles physiopathologiques sous-jacents (Wenz et al, 2001). De plus, la sévérité des signes cliniques des mammites à *E. coli* est positivement corrélée à la concentration de cette bactérie et à la quantité d'endotoxines dans le lait (Lohuis et al, 1990). Par exemple, Wenz, en 2001, a montré que 28, 51 et 77% des vaches présentaient respectivement des signes légers, modérés et sévères avec plus de 100 000 UFC de coliformes/ml au début de l'infection.

La définition des termes léger, modéré et sévère pour caractériser les symptômes d'une mammite n'est pas précise et leur interprétation est souvent assez variable entre les auteurs. Ainsi Wenz a défini ces termes sur la base des signes cliniques. Ces critères permettent alors

de classer les mammites en fonction de leur sévérité. Il a proposé quatre systèmes de score pour les symptômes généraux comme la température rectale, la déshydratation, la motricité ruminale et l'état clinique, mais aussi les signes locaux avec l'aspect de la mamelle et du lait.

*Tableau 1 : Système de classification de la sévérité des mammites coliformes cliniques chez les vaches laitières basé sur les signes cliniques systémiques (Wenz, 2006).*

Variable	Critère	Score
Température rectale, en °C	37-8-39.27	0
	39.33-39.8	1
	< 37,8 ou > 39.8	2
Déshydratation (degré d'énophtalmie)	Absent	0
	Légère	1
	Modérée	2
	Sévère	3
Motricité ruminale, contractions/min	> 2	0
	1	1
	0	2
Attitude : signes de dépression	Absent	0
	Légers	1
	Marqués	2

*Tableau 2 : Bilan des scores cliniques basés sur les signes cliniques systémiques (Wenz, 2006).*

Classification	Score
Légère	0 – 2
Modérée	3 – 5
Sévère	6 – 9

Tableau 3: Système de classification de la sévérité des mammites coliformes cliniques chez les vaches laitières basé sur les signes cliniques locaux (Wenz, 2006).

Variable	Critère	Score
Densité du quartier	+	0
	++	1
	+++	2
Volume	Non modifié	0
	1,5 fois	1
	2 fois	2
Signes de douleur	Absents	0
	Présents	1
Aspect des sécrétions	Non modifiées	0
	Présence de flocons ou de grumeaux	1
	Aspect séreux avec flocons ou de grumeaux	2

Tableau 4: Bilan des scores cliniques basés sur les signes cliniques locaux (Wenz, 2006).

Classification	Score
Légère	0 - 2
Modéré	3 - 4
Sévère	5 - 7

Une de ces études (Wenz et al, 2006) avait pour objectif d'utiliser ce système de classification pour prédire la bactériémie, l'évolution clinique et établir un pronostic chez les vaches laitières atteintes d'une mammite colibacillaire. D'après les résultats de cette étude, il semblerait que l'échelle reposant sur l'appréciation des signes généraux permet d'identifier les vaches qui développent une bactériémie. Au contraire, l'analyse des signes locaux permet plutôt de déterminer le pronostic de l'animal (survie ou réforme/mort).

Toutefois, il faut retenir que la sévérité de la mammites causée par des coliformes est liée à de nombreux facteurs intrinsèques à l'agent (facteurs de virulence...), à l'hôte (stade de lactation, parité, statut immunitaire, fond génétique...) et à l'environnement (saisonnalité, logement).

## 2. Epidémiologie

### 2.1. Epidémiologie descriptive

#### 2.1.1. Incidence et prévalence

Les bactéries à Gram négatif et plus particulièrement les coliformes sont une cause majeure de mammites en élevage bovin laitier (Morin, 2009). *Escherichia coli* est une bactérie fréquemment isolée des mammites. En effet, les mammites à *E. coli* sont la cause la plus fréquente de mammites en début de lactation (Hills, 1994 ; Bradley et Green, 2001). Bien que l'incidence de ces mammites varie d'un pays à l'autre, elle se situe généralement autour de 20% (Poutrel, 2008).

Cette prévalence est toutefois plus élevée si l'on considère les mammites aiguës indépendamment. Par exemple, une étude menée en France a montré qu'*E. coli* était responsable de 42,5% des mammites aiguës (Poutrel, 2008).

L'utilisation d'un produit de pré-trempage au moment de la traite peut réduire l'incidence des nouvelles infections par les coliformes pendant la lactation. Cependant l'utilisation d'un produit de post-trempage semble quant à elle inefficace dans le contrôle des mammites dues à ces bactéries. Ces produits permettent de détruire une grande proportion des bactéries coliformes déjà présentes sur les trayons, mais leur propriété antibactérienne diminue rapidement après leur application. Ainsi la contamination entre les traites, qui est la cause majeure de survenue des mammites à *E. coli*, reste possible (Pankey et al, 1989 ; Bergonier, 2014).

La prévalence des mammites à *E. coli* semble toutefois être sous-estimée. En effet, les méthodes bactériologiques utilisées par certains laboratoires d'analyse ne permettent pas d'isoler la bactérie. Ainsi près de 20 à 30% des échantillons de lait sont déclarés exempts de

bactéries alors que des méthodes adaptées permettraient d'isoler *E. coli* sur ces mêmes échantillons (Poutrel, 2008).

Tableau 5 : Prévalence des mammites cliniques à *E. coli* selon le pays (Bulletin des GTV, 2010).

Pays	Année	Prévalence relative,%
Australie	2009	25,6
Canada	1998	17,2
France	2008	17,0
Royaume-Uni	2004-2005	26,7
Etats-Unis	2007	21,0
Suède	2003	15,9

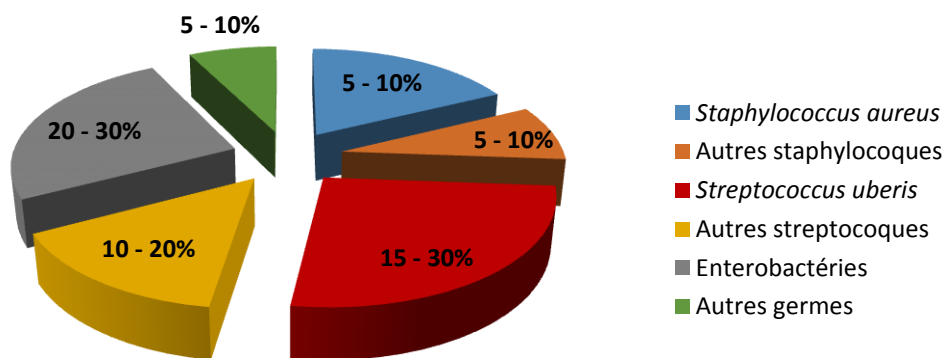


Figure 4: Pourcentages des différents germes isolés lors de mammites cliniques (Bergonier, 2014).

Tableau 6 : Prévalence des agents pathogènes (N=362) impliqués en France dans les mammites aiguës (Poutrel, 2008).

Espèces bactériennes	Pourcentage,%
Gram négatif	47,2
<i>E. coli</i>	42,5
Gram positif	52,8
<i>Strep. uberis</i>	24,9

### 2.1.2. Saisonnalité

La saison influe sur l'apparition de nouvelles infections dues aux coliformes pendant la période sèche et la lactation. Les taux de nouvelles infections et d'apparition des cas cliniques sont plus grands durant les mois les plus chauds de l'année. En effet, le nombre de bactéries à Gram négatif dans la litière est élevé en été et plus bas en hiver. Cependant ces nouvelles infections seraient attribuables à une plus grande concentration de *Klebsiella spp* durant ces mois (Todhunter et al, 1991). Bien que le nombre de mammites causées par *E. coli* soit plus élevé durant l'été, cette augmentation reste faible. En effet, le nombre d'infections dues aux bactéries *E. coli* reste relativement constant au cours des saisons comparativement aux infections à *Klebsiella spp*. Ceci implique que l'exposition à la bactérie *E. coli* est plus constante au cours des saisons que l'exposition à *Klebsiella spp*.



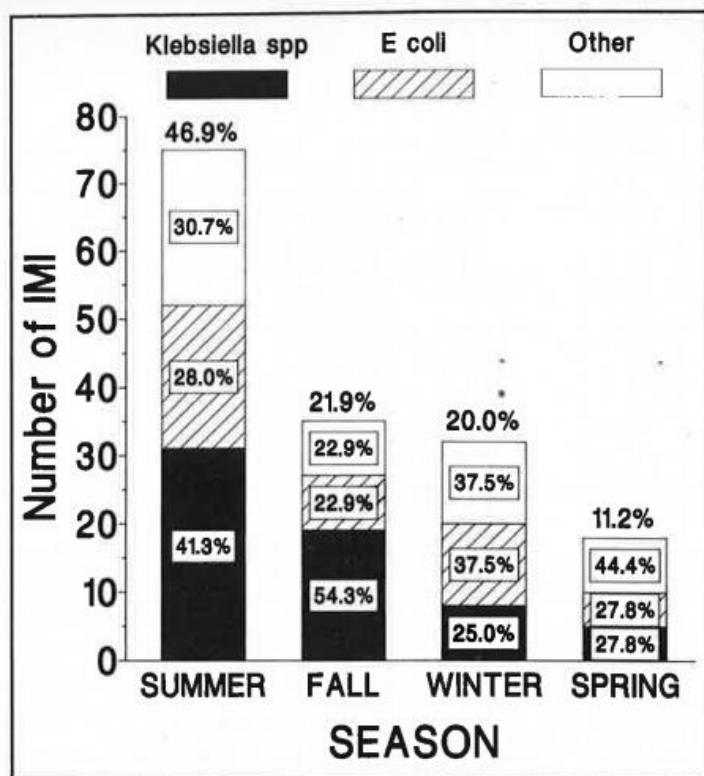


Figure 5: Nombre d'infections intra-mammaires dues aux bactéries à Gram négatif durant les différentes saisons de l'année. (Hiver : Décembre, Janvier, Février ; Printemps : Mars, Avril, Mai ; Été : Juin, Juillet, Août ; Automne : Septembre, Octobre, Novembre). Les valeurs encadrées, sont les pourcentages de *Klebsiella spp*, *Escherichia coli* et les autres bactéries à Gram négatif isolées chez des vaches atteintes d'infection mammaire dues aux bactéries à Gram négatif. Les valeurs au-dessus des barres représentent les pourcentages d'infections intra-mammaires dues aux bactéries à Gram négatif (Todhunter et al, 1991).

Il est également possible que le stress thermique affecte les capacités de défense de l'hôte, qu'il s'agisse des défenses locales et systémiques. Toutefois, cet effet n'a pas été clairement démontré.

Enfin, les périodes chaudes et humides sont propices au développement bactérien dans la litière, augmentant la pression d'infection déjà grande lorsque les vaches sont confinées à l'intérieur.

## 2.2. Epidémiologie analytique

### 2.2.1. Facteurs liés à l'agent

#### 2.2.1.1. Etiologie de l'infection

*E. coli* est une bactérie à Gram négatif. Elle appartient au groupe des Entérobactéries ; elle est commensale de la flore digestive des animaux. Elle est massivement excrétée dans les fèces et dans l'environnement. Lors de mammite bovine, les bactéries isolées ne sont pas considérées comme un groupe pathogène spécifique mais semblent provenir de la flore digestive et de l'environnement (Richards et al, 2015).

Ces bactéries sont donc des agents pathogènes opportunistes, peu adaptés à la glande mammaire mais qui ont la capacité de s'y multiplier.

La température optimale de croissance est de 37°C. Dans les conditions aérobies, la bactérie possède un métabolisme respiratoire. Mais en anaérobiose, elle est capable d'utiliser la fermentation ou la respiration nitrique. *E. coli* peut utiliser des sources de carbone, le substrat préféré étant le glucose ou les nitrites ; elle est aussi capable de fermenter le lactose.

L'identification des différentes souches d'*E. coli* se fait selon trois classes d'antigène de surface :

- Les antigènes de surface : O
- Les antigènes flagellaires : H
- Les antigènes capsulaires : K

*E. coli* possède des capsules (Antigène K), des flagelles (Antigène H) ou des adhésines (fimbriae et pili). Toutes ont une membrane cellulaire caractéristique des Gram négatifs et qui contient un polysaccharide que l'usage désigne le lipopolysaccharide LPS (Antigène O) et de protéines.

#### ❖ Les adhésines

Les adhésines sont des protéines qui permettent l'adhérence aux cellules cibles ; elles ont bien été étudiées pour les épithélia du tractus gastro-intestinal. De plus à cause de leur hydrophobicité, les adhésines permettent une association à la membrane des cellules

phagocytaires. Toutefois les facteurs d'adhésion ne semblent pas jouer un rôle déterminant dans la colonisation de la glande mammaire (Hirsh, 2004).

#### ❖ Les capsules

La capsule polysaccharidique appartient à la membrane externe de la paroi cellulaire des colibacilles (Harrison, 2002). La capsule masque ainsi l'antigène O sous-jacent. Elle assure une protection vis-à-vis de l'activation du complément et empêche l'attachement et la phagocytose par les cellules phagocytaires. La plupart des capsules sont chargées négativement, tout comme les membranes des cellules phagocytaires, créant un effet répulsif (Hirsh, 2004).

#### ❖ La membrane cellulaire

La paroi est composée d'une membrane cytoplasmique interne entourée de peptidoglycane et d'une membrane externe. Cette dernière est caractérisée par la présence du lipopolysaccharide, ainsi que des porines qui sont des protéines constituant des canaux pour la pénétration des nutriments, et éventuellement celle des antibiotiques (Harrison, 2002).

#### ❖ Le lipopolysaccharide ou LPS

C'est le facteur responsable de l'endotoxémie. Il s'agit du facteur de virulence majeur des colibacilles responsables de mammites. Le LPS, issu de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif, a été identifié comme étant la cause de la plupart des réactions physiopathologiques lors de mammite coliforme. Il est constitué de trois segments de nature chimique et de fonctions biologiques différentes. Il existe deux formes différentes du LPS :

- LPS « smooth » qui correspond au LPS complet comprenant les trois constituants
- LPS « rough » qui correspond au LPS dépourvu de la chaîne latérale O et d'une partie plus ou moins étendue du core. Les LPS « rough » peuvent être classés selon l'étendue du déficit moléculaire de Ra à Re (Ra : seule la chaîne

latérale manque ; Re : le LPS est constitué uniquement du lipide A et de l'acide 3-deoxy-D mannose-6-phosphatyle (KDO) (Sprousse, 1990).

- Le lipide A correspond à la partie proximale du LPS qui est enchâssée entre les phospholipides de la membrane externe ; elle est très conservée et de nature hydrophobe. Sa structure est identique chez toutes les espèces d'un même genre et se compose d'un disaccharide, de deux groupes phosphorylés et de cinq à six acides gras. Elle est responsable de l'activité endotoxinique de la bactérie (Brade et al, 1988).
- La partie centrale ou « core » est la partie médiane du LPS divisée en parties : un noyau interne plutôt hydrophobe et un noyau externe plutôt hydrophile, légèrement variable. Le noyau est composé de sucres et de ses dérivés. Le noyau interne est relié au lipide A de façon covalente par l'intermédiaire du KDO. La structure du noyau interne est fortement conservée dans les bactéries à Gram négatif contrairement à celle du noyau externe qui peut être plus variable. Chez *E. coli*, le complexe lipide A-noyau peut servir d'ancrage à l'antigène O ainsi qu'à l'antigène K.
- La chaîne latérale O, la partie distale du LPS, libre dans le milieu extérieur est extrêmement variable. C'est pour cette raison qu'elle peut être utilisée pour le sérotypage des différentes souches d'*E. coli*. De nature polysaccharidique, hydrophile, comme il l'a été expliqué plus tôt, l'antigène O est le composant spécifique du LPS « smooth ». L'antigène O est un polymère d'unités O qui sont des chainons composés de 3 à 8 monosaccharides. C'est donc l'intensité de la polymérisation, ainsi que la nature des oses constituant l'unité O qui sont responsables de la grande variabilité de ce constituant du LPS, et confèrent la spécificité antigénique. Par exemple, on dénombre plus de 170 sérogroupes O pour *E. coli*.

La libération de LPS dans l'organisme déclenche la production de cytokines pro-inflammatoires principalement par les monocytes et les macrophages (Persson et al, 2003).

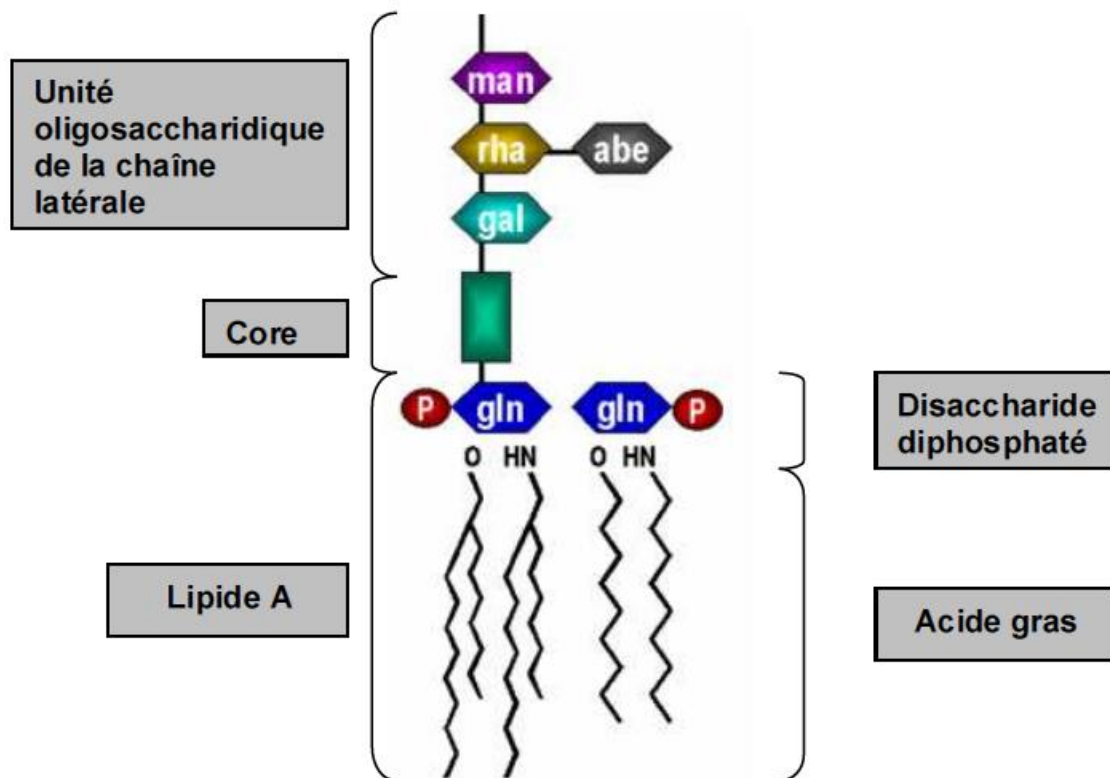


Figure 6 : Structure générale d'un lipopolysaccharide.

#### 2.2.1.2. Facteurs de virulence

##### ❖ Échappement aux défenses immunitaires

La première défense cellulaire de la glande mammaire contre les infections à *E. coli* est le recrutement des neutrophiles et la phagocytose. La quantité bactérienne au pic de la prolifération et la sévérité clinique de la maladie ont été reliées à la rapidité et à l'efficacité de la réponse des neutrophiles. Ainsi la capacité de la bactérie à échapper aux neutrophiles constitue en soi un facteur de virulence (Burvenich et al, 2003). L'exposition de certains antigènes de surface va pouvoir influencer sur la capacité à échapper à la phagocytose.

Par exemple, la présence ou non d'une capsule (antigène K) joue un rôle dans l'échappement à la phagocytose. Les souches d'*E. coli* encapsulées sont plus résistantes à la phagocytose et à la bactéricidie des neutrophiles. Pour l'opsonisation dans des tests in vitro, il faut toujours

plus d'immunoglobulines dans le sérum pour les souches non encapsulées (Hill et al, 1994). Du lait prélevé au milieu de la lactation chez des vaches n'ayant jamais connu d'épisode de mammite au préalable contient des immunoglobulines dirigées contre les souches non encapsulées. Par contre, en début de lactation, le lait contient des immunoglobulines dirigées contre toutes les souches d'*E. coli*. Par conséquent, une mammite sévère à *E. coli* en début de lactation n'est pas due à un déficit de l'activité opsonisante. De plus, certaines souches d'*E. coli* encapsulées sont plutôt associées au développement de mammites chroniques comparées aux souches d'*E. coli* non encapsulées. Il est donc probable que le matériel capsulaire protège la bactérie de l'action des neutrophiles et de la phagocytose.

D'autres composants présents à la surface des bactéries, autres que ceux de la capsule, et qui sont induits par des substrats spécifiques ou des facteurs environnementaux peuvent affecter la capacité à être phagocyté. Par exemple, les *E. coli* possédant les sérotypes O8 ou O9 possèdent des facteurs anti-phagocytaires qui n'ont aucun lien avec la capsule.

Comme la composition des sécrétions mammaires varie en fonction du statut physiologique de l'animal (vache tarie ou en lactation), la diffusion d'*E. coli* capable d'échapper à la phagocytose, et donc au caractère pathogène plus marqué, est aussi modifiée. Les bactéries *E. coli* isolées à partir d'infections mammaires survenues pendant la période péri-parturiente sont plus résistantes à la phagocytose que celles isolées à partir d'infections initiées pendant la période sèche ou la lactation. Ces différences ne sont pas dues au sérotype O (Hogan et al, 2003). Beaucoup d'*E. coli* sont capables d'exprimer des cytotoxines et des hémolysines même si elles n'apparaissent pas comme le mécanisme primordial d'échappement aux défenses de l'hôte.

#### ❖ Sensibilité au sérum

Un facteur de virulence commun à de nombreuses *E. coli* est la résistance à l'activité bactéricide du sérum. Elle n'est pas systématique chez les bactéries capables de provoquer une mammite. De plus, la relation entre la résistance au sérum et la virulence *in vivo* est controversée.

L'activité bactéricide du sérum est due à l'activation du complément. Cette activité est plus grande dans les sécrétions de la glande mammaire involuée que dans le lait collecté durant la lactation. Des constituants du lait diminuent donc l'activité bactéricide du complément.

Cependant la sensibilité au sérum n'est pas différente entre les *E. coli* isolées des glandes mammaires infectées durant la période sèche ou la lactation.

Une étude menée par Hogan sur 35 isolats de coliformes (*K.pneumoniae* et *E. coli*) obtenus lors d'infections mammaires chez la vache montre que la croissance bactérienne dans le lait ne varie pas en fonction du stade physiologique où ils ont été isolés (Hogan et al, 2003).

Les activités bactéricides du sérum sont permises à la fois par la voie classique d'activation du complément et la voie alterne qui est indépendante des anticorps. Cette étude a montré que les *E. coli* isolés d'infections mammaires survenues au cours de la période sèche ne sont pas plus résistantes à l'activité bactéricide que celles isolés chez les vaches laitières en lactation. Cependant, les sécrétions mammaires collectées sur une glande involuée sont plus bactériostatiques que celles collectées durant la fin de la lactation, l'involution ou la colostrogénèse. Cette étude montre aussi que la résistance des *E. coli* au sérum, n'est pas une condition nécessaire à l'apparition d'une infection mammaire. Les *E. coli* qu'ils soient résistants ou non au sérum, ont toutes la capacité à provoquer une mammite. Ainsi les *E. coli* résistants au sérum n'ont pas d'avantage sélectif sur celles plus sensibles aux activités bactéricides du sérum lors d'une infection mammaire spontanée (Hogan et al, 2003).

#### ❖ Production d'endotoxines

Comme indiqué précédemment, le facteur de virulence majeur d'*E. coli* est le LPS. En effet, il est bien connu qu'une injection de LPS dans le canal du trayon ou la citerne permet de reproduire des signes cliniques très similaires à une mammite spontanée provoquée par une infection à *E.coli* (Hogan et al, 2003). De plus, la sévérité de l'inflammation dépend de la dose de LPS injectée.

Les endotoxines jouent donc un rôle majeur dans l'induction de la réponse inflammatoire locale, de même que dans l'apparition des signes systémiques. Une seconde toxine qui est thermo-labile et cytotoxique est impliquée dans la nécrose de la couche superficielle des trayons et des sinus lactifères (Gyles et al, 2011).

## 2.2.2. Facteurs liés à l'hôte

### 2.2.2.1. Âge

Les vaches multipares ont une plus grande réceptivité et sensibilité aux mammites causées par des bactéries à Gram négatif que les primipares ; cette sensibilité augmente avec l'âge. L'incidence des mammites est positivement corrélée avec l'âge et avec le nombre de lactations. Les vaches les plus âgées et ayant vêlé durant l'été représentent la population la plus à risque de développer une mammite coliforme (Smith et al, 1985). La plus grande prédisposition aux infections coliformes des vaches avec un rang de lactation élevé serait la conséquence de modifications physiques telles qu'une modification des tissus du trayon, associée à une perte d'élasticité du sphincter, ainsi que la présence éventuelle de lésions (Poutrel. B, 1983).

Il a été montré que les élevages avec une faible concentration de cellules somatiques dans le lait (CCS) avaient un risque plus grand d'apparition de mammites dites d'environnement contrairement aux élevages avec des CCS moyennes élevées. Toutefois, les CCS sont en général plus élevées chez les vaches les plus âgées alors qu'elles sont plus sensibles aux infections mammaires. Ce paradoxe semble être expliqué par les propriétés des neutrophiles chez ces vaches. Bien que leur nombre soit plus élevé que chez les primipares, la viabilité et la production de molécules d'oxygène toxiques (ROS) sont plus faibles que chez les neutrophiles des vaches primipares (Mehrzaad et al, 2002).

### 2.2.2.2. Stade de lactation

Le taux de nouvelles infections mammaires dues aux coliformes est plus élevé lors de la période sèche et autour du vêlage que pendant la lactation (Eberhart et al, 1979 ; Smith et al, 1985). La période où le taux d'infection par les coliformes est le plus élevé s'étend de la deuxième semaine après le tarissement à la deuxième semaine précédant le vêlage (Smith et Hogan, 2008). Les infections à *E. coli* présentent au vêlage ou au début de la lactation sont le plus souvent initiées durant cette période.

De nombreuses infections ayant eu lieu au cours du tarissement persistent jusqu'au début de la lactation et le vêlage, moments où les signes cliniques apparaissent. Il a été démontré que 65% des cas de mammites cliniques, dues à un coliforme et apparaissant dans les deux premiers mois de la lactation, sont la conséquence d'une infection contractée durant le



tarissement (Smith et al, 1985). Bradley et Green (2000) ont observé que dans 71% des cas de mammites survenues autour du vêlage ont la même souche que celle isolée au tarissement. Il est donc fortement probable que ces infections soient acquises au moment du tarissement ou durant la période sèche, sans qu'il y ait expression clinique.

Si l'on considère le stade lactation, c'est au moment du vêlage que la prévalence des mammites à *E. coli* est la plus élevée ; elle tend à diminuer progressivement au fur et à mesure que la lactation s'avance (Todhunter et al, 1991).

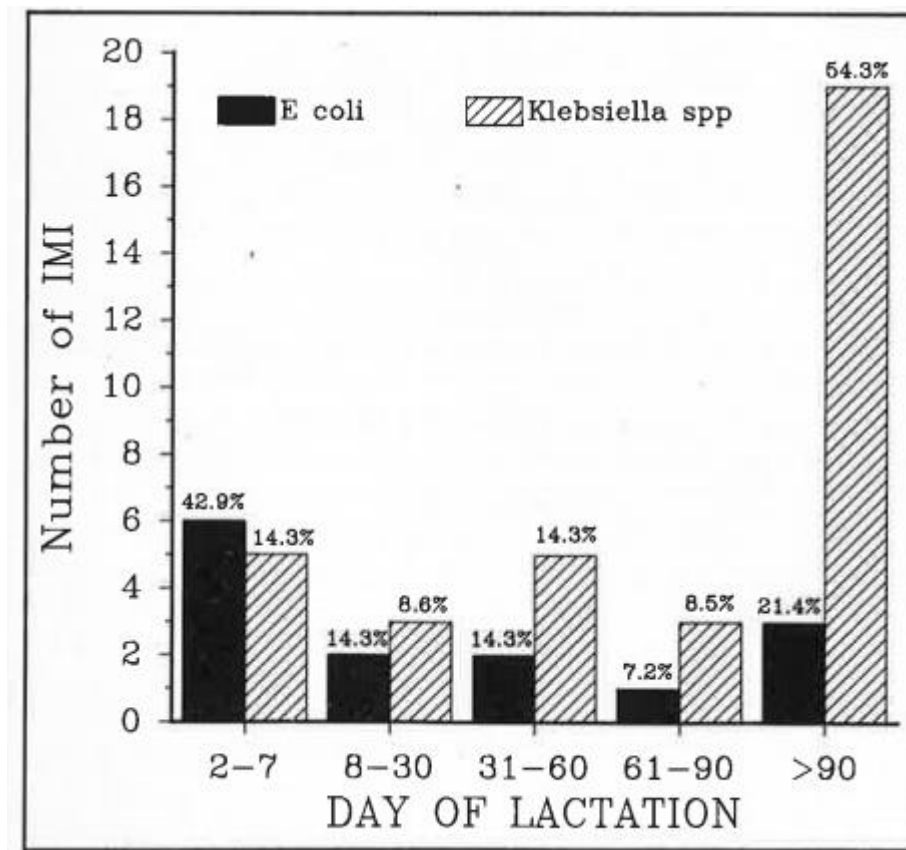


Figure 7: Nombre d'infections mammaires causées par *E. coli*,  $n = 14$  et par *Klebsiella spp*,  $n = 35$  durant la lactation. Les valeurs indiquées au-dessus des barres représentent le pourcentage d'infections mammaires causées par chaque type de bactérie sur une période donnée de la lactation (Todhunter et al, 1991).

Bien que l'infection ait le plus souvent lieu pendant de la période sèche, les symptômes apparaissent en début de lactation. Les quartiers infectés par des coliformes durant la période sèche sont plus susceptibles de développer une mammite clinique due à ces agents que des quartiers non infectés (Bradley et Green, 2000). Ces éléments suggèrent que les infections

chroniques ont un rôle épidémiologique important. Ainsi la gestion des conditions environnementales durant la période sèche a un fort impact sur l'incidence des mammites coliformes au début de la lactation suivante.

La période de la parturition ou les premières semaines de la lactation sont des périodes à haut risque de développer une mammite clinique sévère du fait de la plus grande sensibilité de la vache aux agents pathogènes environnementaux, dont les coliformes. Les vaches sont plus susceptibles de développer des signes cliniques marqués suite à *E. coli*. Cependant autour du vêlage, le nombre et les fonctions des neutrophiles circulants sont diminués. Le recrutement des neutrophiles ainsi que les mécanismes de la phagocytose ou de la bactéricidie sont moins efficaces en début de lactation (Smith, 2009).

Une étude menée par Mehrzad a montré que la viabilité des neutrophiles dans le lait est plus faible au début qu'au milieu ou à la fin de la lactation. La viabilité des neutrophiles dans le sang semble être peu influencée par le stade de lactation. De plus le nombre de neutrophiles dans le lait est plus faible au début de la lactation qu'au milieu et en fin de lactation, en relation probablement avec un effet de la production laitière qui est plus grande et un effet de la dilution. La diminution de la production de ROS (molécules d'oxygène toxiques) chez les vaches en début de lactation semble être corrélée à la diminution de la viabilité des neutrophiles du lait durant cette même période.

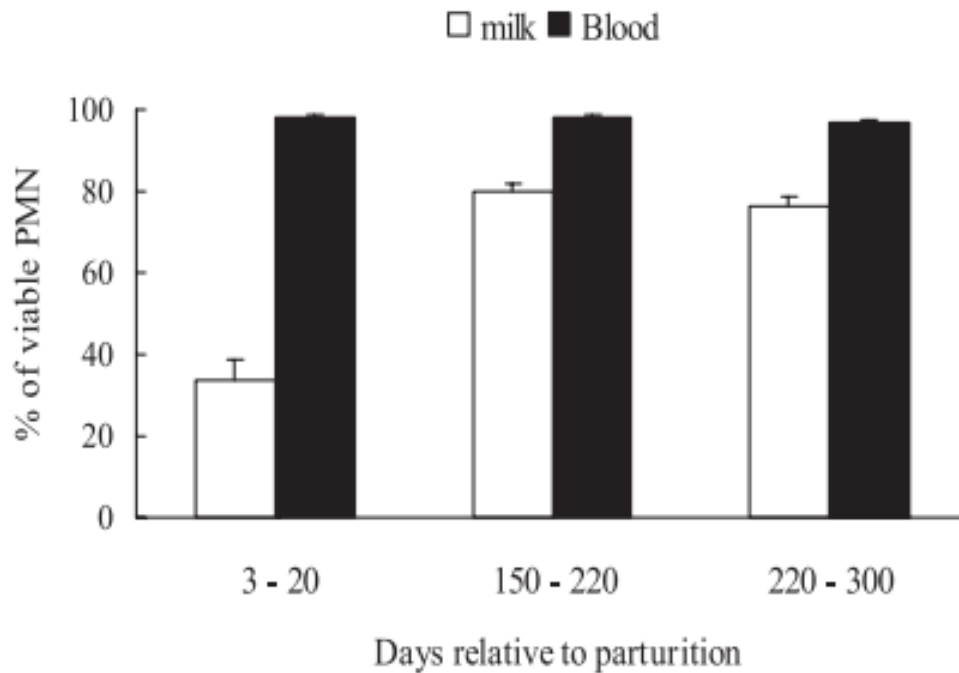


Figure 8 : Viabilité des neutrophiles du lait et du sang en début, milieu et fin de lactation chez les vaches laitières (Mehrzad et al, 2001).

#### 2.2.2.3. Génétique

La grande variabilité de la sensibilité des vaches aux mammites coliformes peut aussi être expliquée par des facteurs génétiques. Pour savoir quel est le poids du fond génétique dans la sensibilité aux mammites, plusieurs paramètres ont été étudiés :

- l'héritabilité mère- fille
- l'influence du facteur paternel chez les filles ou les sœurs

De plus, certains facteurs comme le nombre et la fonctionnalité des neutrophiles au début de la lactation, la concentration du sérum en anticorps et en cellules, ainsi que différents caractères physiques ont été étudiés en relation avec les facteurs génétiques.

L'héritabilité des mammites cliniques est très faible autour de 0,02 (Rupp et Boichard, 2001). L'héritabilité des CCS est un peu supérieure et égale à 0,17. De plus il existe une corrélation génétique positive entre ces deux paramètres qui est de 0,72. Ainsi l'utilisation du paramètre CCS comme critère de sélection permet d'améliorer la résistance aux mammites.

Tableau 7 : Héritabilité du score cellulaire moyen par lactation (SCSL) et des mammites cliniques (MC) et corrélations génétiques avec les caractères de production laitière, la morphologie de la mamelle et la vitesse de traite (Rupp et Boichard, 2001).

	SCSL <sup>(1)</sup>	MC <sup>(2)</sup>
<b>Héritabilité</b>	0,17	0,024
<b>Corrélation génétique avec</b>		
MC	0,72	-
<b>Production laitière</b>		
Quantité de lait	0,15	0,45
Quantité de protéine	0,27	0,41
Quantité de matière grasse	0,11	0,15
Taux protéique	0,20	-0,24
Taux butyreux	-0,02	-0,26
<b>Conformation de la mamelle</b>		
Distance plancher-jarret	- 0,40	- 0,46
Profondeur du sillon	- 0,10	- 0,03
Equilibre	- 0,29	- 0,32
Attache avant	- 0,32	- 0,36
Attache arrière	0,13	- 0,03
Longueur des trayons	0,08	0,12
Implantation des trayons	0,14	0,06
Ecartement des trayons	0,16	0,20
Distance entre trayons	0,26	0,20
<b>Vitesse de traite</b>	0,44	0,06

<sup>(1)</sup> Ecarts types d'estimation des corrélations entre 0,030 et 0,070

<sup>(2)</sup> Ecarts types d'estimation des corrélations entre 0,08 et 0,12

### 2.2.3. Facteurs environnementaux

#### 2.2.3.1. Logement

La multiplication des bactéries à Gram négatif sur la peau des trayons est faible à très faible. Le nombre de bactéries présentes sur la peau des trayons est essentiellement la conséquence des souillures, notamment fécales, et illustre bien le fait que l'exposition de la vache à un environnement contaminant est important dans l'apparition des mammites provoquées par ces germes.

Les mammites dues à *E. coli* sont habituellement classées en tant que mammites dites d'environnement, c'est-à-dire celles pour lesquelles l'environnement des animaux constitue la première source de contamination. En effet, la source principale est la matière fécale présente dans l'environnement de la vache. L'infection de la mamelle a lieu lors d'un contact entre les trayons et un milieu contaminé (Smith et Hogan, 2008). La litière reste toutefois la principale source de contamination bactérienne. La population de bactéries à Gram négatif dans la litière

est positivement corrélée au nombre de bactérie sur les trayons et le taux de mammites cliniques.

Réduire le nombre de bactéries dans la litière permet de diminuer le risque d'apparition d'une mammite causée par un coliforme. L'utilisation de litières composées de matériaux inorganiques comme le sable naturel ou obtenu par concassage, permet une exposition moindre des vaches aux bactéries par rapport aux litières constituées de matériaux organiques tels que le bois ou la paille.

Les litières organiques faites de paille, de sciure ou de copeaux de bois sont favorables au développement d'*E. coli*. En effet, les copeaux de bois, la paille, le fumier recyclé ou les rafles de maïs, qui sont les principaux supports utilisés comme litière, peuvent contenir plus de  $10^6$  UFC/gramme de litière (Hogan et al, 1989). Cette quantité est d'autant plus grande que la température et l'humidité sont élevées. Afin de diminuer le risque de contamination, la litière doit être sèche et ne doit pas excéder une température de 38°C (Morin, 2009).

De plus, la surpopulation ou une fréquence insuffisante de nettoyage des aires d'activité des animaux, un temps trop court entre la fin de la traite et le retour dans la zone de couchage sont autant de facteurs qui augmentent la pression d'infection et la survenue des mammites. La conception du bâtiment doit être réfléchiée pour éviter l'apparition de lésions du trayon qui peuvent aussi augmenter l'incidence des mammites. Ainsi, il faut veiller à un bon dimensionnement des logettes afin de permettre un relever aisé des vaches, et un couchage confortable.

#### 2.2.3.2. Rationnement

Le peri-partum représente la période durant laquelle des déficits énergétique et protéique sont souvent présents. Ainsi l'augmentation de la concentration plasmatique des corps cétoniques a un impact négatif sur les fonctions des neutrophiles et est associée à une plus grande sensibilité aux mammites. En effet, la phagocytose et l'activité bactéricide des neutrophiles semblent altérées lors de cétose. De plus, il a été montré que le recrutement des leucocytes dans le parenchyme mammaire est moins efficace chez les vaches en cétose. Leur nombre dans le sang diminue en cas de cétose. Enfin, lors d'une infection bactérienne, la quantité de cytokines produites est moins grande chez les vaches avec une hypercétonémie. Ainsi tous ces

éléments montrent que les mécanismes de défense de la mamelle sont altérés en cas de déficit énergétique (Suriyasathaporn et al, 2000).

Deux nutriments essentiels pour la santé de la mamelle sont la vitamine E et le sélénium. Ces derniers interviennent dans les fonctions anti-oxydantes au niveau tissulaire et cellulaire. En effet, la glutathion peroxydase, dont la fonction est régulée par ces deux composés, permet de protéger les neutrophiles et les macrophages de l'action destructrice des molécules d'oxygène toxiques (ROS) qui sont produites lors de l'explosion respiratoire. La couverture des besoins en sélénium est nécessaire pour préserver la capacité de recrutement tissulaire et l'activité phagocytaire des neutrophiles. Une supplémentation en vitamine E en début de lactation permet, quant à elle, d'augmenter l'activité bactéricide des neutrophiles sanguins. Ainsi un déficit en vitamine E ou en sélénium est positivement corrélé avec une augmentation de l'incidence et de la sévérité des mammites (Hogan et al, 1993).

### **3. Physiopathologie des mammites à *Escherichia coli***

#### 3.1. Infection et colonisation de la glande mammaire

Comme indiqué précédemment, la principale source d'infection est l'environnement. Ainsi, la transmission horizontale lors de la traite entre un animal infecté et un animal sain est minime dans la plupart des cas, sauf pour les isolats capables d'établir des infections chroniques. Donc l'infection peut se produire au moment de la traite, entre les traites ou même en dehors de la période de lactation. La diffusion d'*E. coli* dans la glande mammaire par voie vasculaire ou lymphatique apparaît minime. Les infections mammaires causées par les germes à Gram négatif sont surtout dues à la pénétration dans la glande à travers le sphincter, et la multiplication dans le canal du trayon et la citerne, avant de diffuser à une part plus ou moins grande dans les canaux lactifères de la glande (Hogan et Smith, 2003).

##### 3.1.1. Passage à travers le sphincter

Le sphincter et le canal du trayon correspondent à la porte d'entrée des germes coliformes dans la glande mammaire. La mammite se développe lorsque que des germes passent au-delà

du sphincter du trayon. Le plus souvent, la contamination a lieu après la traite quand le sphincter du trayon est encore ouvert. Suite au contact direct avec l'environnement contaminé, *E. coli* pénètre dans le trayon puis se multiplie dans la citerne du trayon et diffuse dans les sinus lactifères. Toutefois, les mécanismes initiaux de diffusion restent encore méconnus mais il est probable qu'une partie du canal soit contournée. Le sphincter et le canal du trayon sont donc des barrières physiques. C'est une zone kératinisée où existent de fortes concentrations d'antibactériens, qui n'est donc pas propice à la colonisation par *E. coli* (Hogan et Smith, 2003).

### 3.1.2. Multiplication dans la glande mammaire

La glande mammaire ne possède pas de flore résidente. Il est admis que les surfaces épithéliales sont physiologiquement dépourvues de bactéries, même si cette notion est actuellement largement débattue.

L'adhérence d'*E. coli* à l'épithélium mammaire ne semble pas jouer un rôle dans la pathogénicité des mammites (Opdebeck et al, 1999). Après une épreuve infectieuse intramammaire par *E. coli*, aucun attachement à l'épithélium mammaire n'a été observé. En effet, les bactéries ne semblent pas coloniser la glande mammaire mais plutôt se multiplier dans les sécrétions sans attachement à l'épithélium (Morin, 2009). Le nombre de bactéries augmente d'autant plus rapidement, qu'elles sont capables d'adapter leur métabolisme à la composition des sécrétions mammaires. Ainsi, la sévérité de la mammite est proportionnelle à la concentration de bactéries capable de se multiplier dans les sécrétions mammaires (Hogan et Smith, 2003).

Les deux facteurs de virulence que sont l'utilisation du lactose et l'acquisition du fer jouent un rôle primordial. En effet, les *E. coli* sont capables d'utiliser le lactose comme source d'énergie et ainsi de survivre dans des conditions proches de l'anaérobiose. Le lactose est le principal glucide présent dans le lait. L'oxygène y est présent en faible quantité. Par conséquent, les bactéries ont une croissance exponentielle dans le sinus galactophore. Un pic bactérien est atteint au bout de 12h avec en moyenne 1 000 000 UFC/ml (Erskine, 2002). Il est parfois possible que la population d'*E. coli* puisse excéder  $10^8$  UFC/ml.

Le facteur nutritionnel limitant est le fer dans la glande mammaire tarie. En effet, la lactoferrine est une protéine qui lie le fer. Sa concentration augmente dans les sécrétions

mammaires durant l'involution jusqu'à la colostrogenèse rendant le fer indisponible pour bactéries (Smith et al, 1977). Contrairement à *Klebsiella*, les *E. coli* maîtrisent assez difficilement les effets inhibiteurs de la lactoferrine et donc sont moins aptes à infecter la glande mammaire en involution. Toutefois, cette infection est possible par l'utilisation d'un système qui permet de capter le fer avec une plus grande affinité que celle de la lactoferrine. Ce système est donc communément exprimé chez les bactéries à Gram négatifs isolées dans les glandes involuées ou en involution. Ce système joue un rôle primordial dans la pathogénicité de l'infection durant la période sèche.

Dans la période autour de la parturition ou en début de lactation, la multiplication plus grande d'*E. coli* dans la glande mammaire est permise par plusieurs facteurs, dont les principaux sont la faible concentration de la lactoferrine dans le lait durant cette période rendant le fer disponible pour les bactéries, et une réponse plus tardive et moins efficace des neutrophiles.

### 3.1.3. Adhésion et colonisation

Le tropisme cellulaire, c'est-à-dire l'attachement aux cellules, dépend beaucoup de la souche d'*E. coli* mise en jeu. Elle est très variable, de très faible à très efficace. Si l'attachement aux cellules épithéliales n'a pas été démontré, il est toutefois possible que les bactéries puissent se lier à d'autres cellules du tissu (Opdebeck, et al, 1999). Par exemple, la fibronectine est une glycoprotéine de haut poids moléculaire produite par les cellules mammaires. Une étude (Faris et al, 1987) a montré *in vitro* que 53/70 souches d'*E. coli* isolés à partir de mammites bovines étaient capables de se lier à la fibronectine. Toutefois, la fibronectine n'est pas présente au pôle apical des cellules épithéliales mammaires ; elle est plutôt un composant de la membrane basale sous forme de matrice insoluble. Elle est aussi présente à la surface des cellules myo-épithéliales et des fibroblastes. De plus *in vivo*, l'attachement à la fibronectine semble encore discutable et ses effets seraient limités.

En général, les bactéries n'envahissent pas le tissu mammaire mais restent dans la lumière de la glande, citernes et sinus lactifères.

Lors de mammites sévères d'évolution aiguë, la pathogénicité n'est pas liée à l'invasion et à la colonisation de l'épithélium. Pour une mammite chronique, il peut se produire un attachement temporaire, réversible et relativement faible d'*E. coli* avec l'épithélium intact du sinus lactifère. On ne peut pas le qualifier d'adhésion car il ne comprend pas la fixation à un



récepteur comme c'est le cas de certaines souches d'*E. coli* à la membrane des entérocytes. Cependant cette liaison peut éventuellement déclencher la libération de cytokines dans un second temps, qui attirent alors les cellules inflammatoires (Burvenich et al, 2003). En effet, Shpighel et son équipe (2008) ont montré qu'une souche d'*E. coli* pouvait être internalisée dans les cellules mammaires épithéliales chez la souris invalidée pour le récepteur TLR4 (Toll-Like Receptor 4). Ces bactéries créaient alors de micro-colonies. Toutefois, cette internalisation ne s'accompagne pas d'une inflammation et les bactéries semblent entrer en latence. Ce phénomène, s'il existe chez la vache, expliquerait les conditions d'apparitions des infections chroniques.

#### 3.1.4. Persistance

Comme il l'a été dit précédemment, certaines mammites à *E. coli* peuvent évoluer de façon chronique bien que, dans la plupart des cas, elles aient un caractère transitoire se terminant par l'élimination de la bactérie, et quelquefois celle de l'hôte.

Lors d'isolements répétés d'*E. coli* à partir d'un même quartier, deux hypothèses ont été formulées. Dans un premier temps, il peut s'agir de rechutes, c'est-à-dire, de phases alternées et répétitives d'infection et de guérison. Cette situation se présente lorsque l'hôte est particulièrement sensible à ce type d'infection du fait de la présence de facteurs de prédisposition. Toutefois, dans ce cas, les bactéries isolées à chacun de ces différents épisodes seraient distinctes d'un point de vue génétique. En effet, la probabilité d'une nouvelle infection par la même souche d'*E. coli* à partir de l'environnement est quasiment nulle étant donné la diversité des types bactériens qui y sont présents.

Dans un second temps, il peut s'agir d'une infection persistante. La vache atteinte présenterait alternativement des épisodes de mammites subcliniques et de mammites cliniques. A la différence de l'hypothèse précédente, une infection mammaire persistante n'est due qu'à une unique souche bactérienne qui reste présente dans la glande mammaire sur une longue période (Zadoks et al, 2011).

De rares souches d'*E. coli* ont la capacité de persister au niveau mammaire, ce mécanisme ayant une faible importance clinique (Bradley et Green, 2001). En effet, Lam et al (1996) ont montré que seulement 9% des quartiers ayant présenté des épisodes de mammites récurrents étaient infectées par la même souche d'*E. coli*.

Une étude menée sur 300 fermes laitières au Pays-Bas a montré que 4,8% de tous les épisodes de mammites cliniques à *E. coli* correspondaient à une persistance de la bactérie dans la glande mammaire et que tous les *E. coli* isolés possédaient le même génotype (Döpfer et al, 1999). Par ailleurs, certaines de ces souches à l'origine d'infection persistante ont la capacité de pénétrer à l'intérieur des cellules épithéliales.

Une autre étude menée au Royaume-Uni dans six fermes a montré cette fois-ci que 20,5% de tous les épisodes de mammites cliniques à *E. coli* correspondaient à des infections persistantes (Bradley et Green, 2001).

Cette persistance de la bactérie dans le tissu mammaire peut avoir deux origines, soit une plus grande sensibilité de l'hôte soit l'apparition de souches bactériennes plus adaptées à l'environnement mammaire.

De plus, il peut exister des mammites récurrentes à *E. coli* dans différents quartiers. En effet, l'équipe de Bradley (Bradley et Green, 2001) a montré que les différents quartiers atteints de mammites chroniques présentaient le même génotype bactérien dans 8,5% des cas. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène :

- Les différents quartiers ont pu être infectés simultanément et l'expression des signes cliniques est différée dans le temps. Cependant pour que plusieurs quartiers soient infectés en même temps par la même souche d'*E. coli*, il est nécessaire d'avoir une forte pression d'infection de cette souche d'*E. coli* dans l'environnement. Or c'est très peu probable qu'un seul génotype d'*E. coli* soit présent étant donné la diversité génétique de cette bactérie. Cette possibilité semble donc très peu probable.
- L'agent infectieux se transmet d'un quartier à un autre ce qui correspondrait à un phénomène de contagion localisé à la glande mammaire. La transmission d'un agent infectieux d'un quartier à l'autre par contagion avait déjà été mise en évidence pour des mammites causées par d'autres bactéries telles que *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus agalactiae* ; il s'agit alors d'un mode de contamination au moment de la traite.

### 3.2. Réponse de l'hôte

Pour réduire la probabilité d'apparition d'une infection mammaire, la glande mammaire des bovins possède des mécanismes de défense qui limitent la pénétration et la colonisation des bactéries.

#### 3.2.1. Mécanismes physiques de défense

La mamelle est un organe pesant jusqu'à 50 kg chez les vaches dont le niveau de production est le plus élevé. Elle est fortement soutenue par des ligaments médians et latéraux permettant de maintenir les trayons verticaux et évitant ainsi que le plancher de la mamelle ne s'affaisse ; une mamelle fortement décrochée serait plus fréquemment souillée.

La peau du trayon est glabre et dépourvue de glandes ou de muqueuses. L'hydratation de la peau du trayon est donc un élément important car elle permet de créer une pellicule hydro-lipidique recouvrant l'épiderme. Cette dernière permet de limiter l'adhésion et la pénétration de germes pathogènes. De même, une déshydratation de la peau conduit à une diminution de son élasticité, éventuellement associée à l'apparition de lésions de l'épiderme, comme des crevasses voire des plaies qui sont plus facilement colonisables par des germes (Rémy, 2010).

La séparation physique des quartiers est permise par la lame fibreuse qui partage la mamelle en deux hémi-mamelles ; elle permet de limiter la diffusion par proximité d'un agent infectieux entre les hémi-mamelles. Toutefois, les parenchymes des quartiers arrière et avant d'un même côté sont contigus. Ainsi l'infection peut diffuser d'un même côté (Rémy, 2010).

La première ligne de défense de la glande mammaire est l'extrémité et le canal du trayon. Alors qu'il représente la principale voie d'entrée des germes, différentes structures physiques permettent de limiter cette contamination.

A l'extrémité distale du canal, le sphincter du trayon est équipé de muscles annulaires. Il permet de maintenir le canal fermé entre deux traites. Le sphincter empêche donc la pénétration des bactéries. Après la traite, deux heures sont nécessaires à la fermeture complète du trayon suite à la contraction du sphincter.

Le canal mesure entre 5 et 13 mm de long et 0,4 mm de diamètre. L'épithélium du canal est plus stratifié et pavimenteux que celui du reste du trayon. L'accumulation de kératine lors de la dégénérescence de la couche cornée forme un bouchon, et constitue ainsi un piège mécanique pour les bactéries. La kératine peut aussi fixer et immobiliser certaines souches de

bactéries non encapsulées. Il s'agit du phénomène d'adsorption. L'éjection des premiers jets permet l'élimination de ce bouchon de kératine ainsi que des bactéries piégées qu'il contient (Boudry 2005 ; Rainard et Riollet, 2006).

La paroi du canal du trayon est aussi recouverte de nombreux acides gras aux propriétés antibactériennes bactériostatiques comme l'acide myristique, palmitoléique et linoléique (Boutet, 2006).

A l'extrémité interne du canal se trouve la rosette de Fürstenberg qui constitue une barrière mécanique avec un repli muqueux, mais surtout une formation lymphoïde qui constitue le point d'entrée et d'activation des leucocytes.

Cependant, l'utilisation de la traite mécanique et un mauvais réglage des équipements, ont tendance à altérer les défenses physiques du fait des contraintes mécaniques qui s'appliquent.

### 3.2.2. Mécanisme de défense immunitaire

Les barrières naturelles sont toutefois insuffisantes à prévenir totalement l'infection, et certains germes parviennent à traverser le canal du trayon pour gagner la citerne située au-delà. Dès lors, ce sont des mécanismes de défense qui sont issus soit de l'immunité innée, soit de l'immunité adaptative qui contrôlent l'établissement de l'infection. Ces deux catégories d'immunité coopèrent afin de maintenir l'intégrité de la mamelle.

#### 3.2.2.1. Immunité innée

On considère qu'il s'agit des mécanismes de défense prédominants dans la glande mammaire. L'immunité innée fait intervenir des composants cellulaires et des composants humoraux qui reconnaissent des antigènes étrangers tels que les MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns). Les MAMPs sont des molécules reconnues étrangères entre des espèces différentes (Janeway et Medzithov, 2002). Cette reconnaissance se fait par l'intermédiaire des récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptors) tels que les récepteurs TLR (Toll-Like Receptor) et CLR (C-type Lectin Receptors).

## ❖ Immunité cellulaire

Le lait d'une mamelle saine contient très peu de cellules ( $< 10^5$  voire  $10^4$ /ml) car la mamelle est un organe sécrétoire holocrine. Il s'agit principalement de neutrophiles, de macrophages et de cellules T, qui sont communément désignées cellules somatiques, par opposition aux cellules bactériennes.

Il existe différents seuils de la concentration de cellules somatiques (CCS) pour évaluer la santé de la mamelle. Un quartier est généralement considéré comme sain si la CCS est inférieure à 100 000 cellules/ml et que la proportion de neutrophiles est faible (Burvenich et al, 2002). Toutefois, un seuil plus élevé est communément utilisé en élevage, une mammite est détectée lorsque la CCS est supérieure à 300 000 cellules/ml. La CCS est un bon indicateur de la santé de la mamelle car il existe une corrélation indirecte entre la CCS et la présence d'une infection mammaire (Schukken et al, 1994). Les CCS sont ainsi mesurées périodiquement (une fois par mois environ) afin d'évaluer le statut mammaire de chaque vache et de connaître ainsi le taux de mammites principalement subcliniques présentes dans le troupeau.

### ▪ *Détecteurs de MAMPS : TLR et NOD*

Les récepteurs PRR de nature protéique sont exprimés à la surface d'un grand nombre de cellules telles que les macrophages, les monocytes, les cellules épithéliales et les neutrophiles. Ces récepteurs transmembranaires permettent de reconnaître certains MAMPs situés à la surface des agents pathogènes. Les TLRs ont une portion extramembranaire (LRR : leucine rich repeats) qui interagit avec l'antigène bactérien et une portion intramembranaire (TIR domain) nécessaire à la transduction du signal.

Tableau 8 : Récapitulatif des PRR et de leurs principaux ligands (Werling et al, 2007 ; Chang et al, 2009 ; Jungi et al, 2010).

Groupe	Membres	Ligands connus
Famille des MMR	MMR	HIV, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Candida albicans</i>
	DEC205	Unknown
Collectins	MBL	HIV, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>
	SP-A	RSV, HSV-1, <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i>
	SP-D	RSV, <i>M.tuberculosis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Pseudomonas aerogonosa</i>
C-type lectin R	DC-SIGN	HIV, HCV, Dengue, <i>M. tuberculosis</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i> .
	Dectin-1	<i>Pneumocystis</i> , <i>C. albicans</i>
Famille des TLR	TLR1-10 TLR2 TLR4 TLR5-TLR9	Peptidoglycane et acide lipotéichoïque (LTA) des bactéries Gram + Lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram - Flagelline chez <i>E. coli</i>
	LBP CD14	LPS-binding protein (LBP) LPS en présence de LBP
	récepteur à FMLP	peptides fMet-Leu
	NOD1 NO D2	molécules bactériennes avec D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid (iE-DAP)
Complément	C3b properdin	surface cellulaire des bactéries aide au fonctionnement de C3b

Par exemple, TLR4 reconnaît principalement les LPS des bactéries à Gram négatif (Miller et al 2005). Les gènes codant TLR2 et TLR4 sont surexprimés lors de mammites à *E. coli* (Goldammer et al, 2004). En effet, au début de l'infection, l'expression de TLR2 et de TLR4 est augmentée à la surface des cellules épithéliales mammaires. Les TLR 2, 4 et 5 partagent une même voie de signalisation (impliquant la molécule MyD88) qui entraîne l'expression de gènes impliqués dans le contrôle de l'infection ; elle aboutit à l'activation de facteurs nucléaires NFκB (Nuclear Factor Kappa B) et AP-1 (Activated Protein-1) qui déclenchent l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires et permet la communication entre les cellules immunitaires. Le TLR 4 utilise aussi une voie particulière qui permet l'activation de la voie des interférons de type 1.

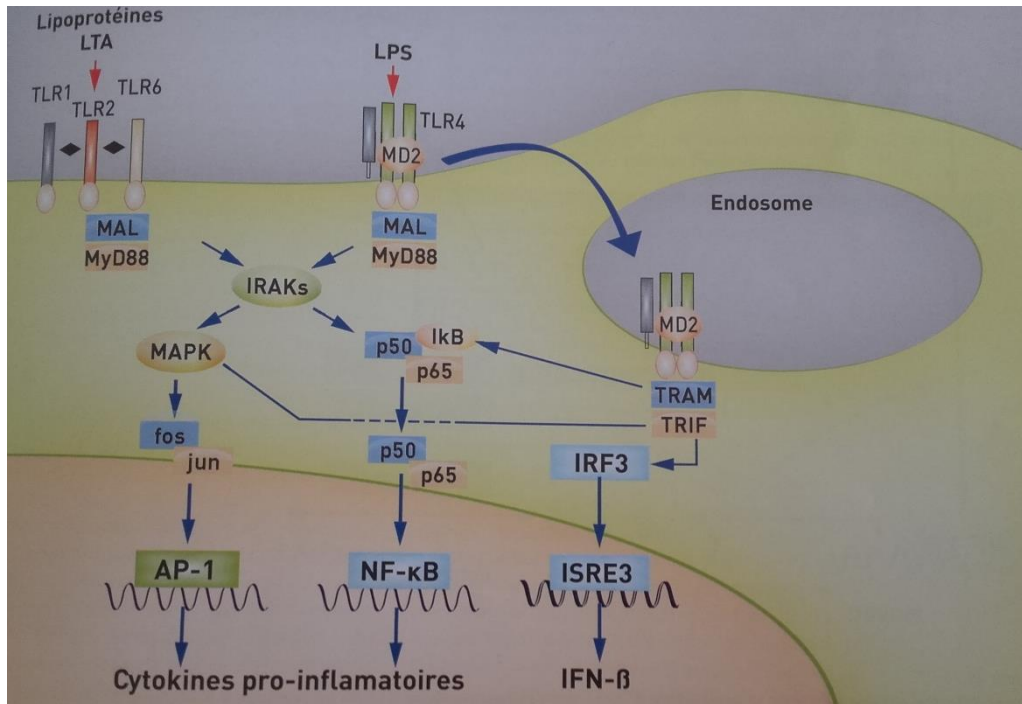


Figure 9 : Représentation simplifiée des principales voies de signalisation en aval des TLR (Tadoka et al, 2008).

Les récepteurs NLRs (Nod-Like Receptors) NOD 1 et NOD 2 sont cytosoliques. Ils sont composés d'un domaine LRR, d'un domaine NOD (nucleotide-binding Oligomerization Domain) et un ou deux domaines CARD (Caspase Recruitment Domain). Ils ne sont activés que lorsque certains MAMPs pénètrent à l'intérieur de la cellule. Ils reconnaissent des éléments constitutifs du peptidoglycane de la paroi de certaines bactéries. Les voies de signalisation peuvent être différentes de celles utilisées par les TLRs ; ils peuvent donc fonctionner indépendamment des TLRs. Néanmoins ces deux types de récepteurs agissent en synergie, comme par exemple celle qui existe entre NOD2 et TLR 2 ou TLR4. Les NOD sont principalement exprimés par les cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques ou les macrophages (Sirard et al, 2007).

Enfin les inflammasomes sont des assemblages protéiques qui se forment dans le cytosol suite à l'activation de la cellule, notamment par un motif bactérien. Ils activent la capsase-1 qui permet la maturation de la pro-IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$ . En général, il faut la stimulation simultanée d'un TLR et d'un inflammasome pour aboutir à la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (Bannerman et al, 2004).

- *Les granulocytes neutrophiles (GNN)*

Les neutrophiles, communément désignés par l'acronyme GNN ou PMN, sont physiologiquement présents dans le lait, mais à de faibles concentrations, ce qui ne permet pas d'assurer une lutte antibactérienne suffisante et efficace. Ils représentent 15 à 45% des leucocytes (Jain, 1986). Cependant, les GNN sont le type cellulaire prédominant retrouvé dans les tissus et les sécrétions mammaires lors d'inflammation (Sordillo et Stricher, 2002). Il a été démontré (Rainard et Riollet, 2006) que la concentration de neutrophiles dans le lait d'une glande saine est inversement proportionnelle au risque de mammite. La présence ou le recrutement efficace de neutrophiles sont donc suffisants pour diminuer le risque de mammite.

L'essentiel des neutrophiles présents dans la glande mammaire et le lait, soit environ 90%, provient du recrutement des GNN à partir de la paroi des vaisseaux sanguins. Les 10% restants sont résidents dans la glande mammaire saine. La diapédèse des neutrophiles est guidée par certains signaux inflammatoires tels que les fractions C5a et C3a du complément, les interleukines IL-1, 2, et 8. En effet, lors de mammites à *E. coli*, le C5a est déjà présent en grande quantité dans le lait (Paape et al, 2003). De même, lors d'une infection à *E. coli*, des cytokines pro-inflammatoires (comme l'IL-1) sont présentes en grande quantité dans le lait quelques heures après le début de l'infection. S'en suit un important recrutement des GNN environ 3 à 12 heures après le début de l'infection, avec un retour à la normale dans les 24 heures (Riollet et al, 2000). Les GNN doivent traverser l'endothélium, la matrice sous-épithéliale, la membrane basale et l'épithélium mammaire pour se retrouver dans le lait. Cette migration est facilitée par la présence de métalloprotéases matricielles libérées par les GNN. Ces dernières permettent d'assurer une perméabilité de la matrice extracellulaire en dégradant le collagène, la lamine, les fibronectines et l'élastine (Suriyasathaporn et al, 2000).

Néanmoins les capacités fonctionnelles des neutrophiles présents dans le lait semblent être moindres par rapport à celles des neutrophiles du sang pour différentes raisons :

- l'ingestion de globules gras et de caséines par les neutrophiles diminue la quantité de granules cytoplasmiques, et par conséquent diminue leur activité bactéricide ainsi que la formation de pseudopodes indispensables à la phagocytose.



- la diapédèse des neutrophiles à travers l'épithélium mammaire entraîne une diminution de la production de réactifs oxygénés et une activité bactéricide moins efficace
- les réserves de glycogène sont moindres dans les neutrophiles du lait. Ils ont donc moins d'énergie, 3% de moins que ceux du sang pour la phagocytose
- les glucocorticoïdes associés à certains traitements antibiotiques à usage intramammaire diminuent la phagocytose
- la faible concentration d'opsonines dont le rôle est d'augmenter la phagocytose dans le lait

A leur arrivée au sein du site infectieux, les neutrophiles reconnaissent les agents pathogènes grâce à des récepteurs immunologiques, CR1, CR3, FcR ou non-immunologiques (glycoprotéines) présents à la surface des cellules, et des anticorps (immunoglobuline M (IgM), immunoglobuline G2 (IgG2)) qui se fixent sur les bactéries. Ils phagocytent les bactéries et ainsi les éliminent grâce à l'explosion respiratoire. Différentes cytokines inflammatoires telles que IL-1, TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$  permettent d'augmenter la phagocytose, ainsi que le pouvoir bactéricide des neutrophiles (Sordillo et Babiuk, 1991). L'activité bactéricide des neutrophiles est permise par deux mécanismes dépendants ou non de l'oxygène. A la suite de la fixation d'éléments du complément ou d'immunoglobulines sur les récepteurs des neutrophiles, ils libèrent des radicaux oxygénés (ROS) et des protéases qui sont susceptibles de tuer la plupart des agents pathogènes responsables de mammites (Paape et al, 2002). Toutefois, ces éléments bactéricides sont également cytotoxiques pour le tissu mammaire. Ainsi une inflammation prolongée entraîne des lésions de l'épithélium et aboutit à une perte de la fonction de production laitière. Après l'ingestion des bactéries, les GNN meurent par apoptose ou mort programmé ; leur élimination est permise par les macrophages qui phagocytent les corps apoptiques (Paape et al, 2003).

Outre leur capacité à produire des radicaux libres et des protéases, les neutrophiles sont une source de peptides antimicrobiens, AMP (Antimicrobial Peptide) comme les lactoferrines, les bacténécines, les défensines et les cathélicidines qui seront décrites ultérieurement.

### ▪ *Les macrophages*

Les monocytes représentent 2 à 7% des leucocytes sanguins dans l'espèce bovine (Jain, 1986). Lorsqu'ils quittent la circulation sanguine vers les tissus, ils évoluent en macrophages différenciés. Dans la glande mammaire en dehors d'une infection, les macrophages représentent le type cellulaire le plus fréquent dans le lait. Ses principaux rôles sont la phagocytose, la digestion de micro-organismes, de cellules endommagées, de matrices tissulaires, des neutrophiles en apoptose ainsi que des globules gras du lait lors de l'involution mammaire. Toutefois, leur efficacité est moindre par rapport à celles des neutrophiles, et elle est deux fois moins grande pour les cellules du lait que celles du sang.

La phagocytose des germes permet d'activer les macrophages qui libèrent alors des substances chimiotactiques permettant l'afflux des neutrophiles (Craven, 1983). Ils permettent ainsi à la fois d'initier mais aussi d'amplifier la réponse inflammatoire. Les macrophages sont aussi des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Ils exposent à leur surface certains fragments des éléments pathogènes afin d'activer les lymphocytes T et d'autres CPA comme les cellules dendritiques ou les lymphocytes B, ce qui aboutit à la production de cytokines. Les macrophages interviennent donc aussi dans la mise en place de la réponse adaptative. Lors d'une diminution de la quantité d'immunoglobulines, une diminution de la phagocytose des macrophages est généralement associée (Waller 2000).

Les macrophages mammaires sont capables de libérer des chimiokines telles que l'IL-8, des prostaglandines, des métabolites de l'acide arachidonique ou le PAF (*Platelet-Activating Factor*). Ceci a pour effet d'amplifier la réponse inflammatoire locale (Sordillo et Streicher, 2002). De plus, lors d'une infection, les macrophages sont capables de sécréter de l'IL-12 qui participe au développement des cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> cytotoxiques capables de synthétiser l'IFN- $\gamma$  (Riollet et al, 2000).

Un complexe enzymatique, la Nitric Oxide Synthase (NOS) est une enzyme importante dans l'activité des macrophages activés. En effet, elle permet la conversion de l'arginine en citrulline et en oxyde nitrique (NO). Ce dernier est un radical hautement réactif. Il a une durée de vie courte et réagit avec l'oxygène pour donner du nitrite (NO<sub>2</sub>) et du nitrate (NO<sub>3</sub>). Bien que la concentration en NO soit faible dans le lait et le colostrum des mamelles saines, elle augmente temporairement après une injection de LPS d'*E. coli* ou de façon plus prolongée lors d'une infection par *E. coli* (Rainard et Riollet 2006).

- *Les cellules Natural Killer (NK)*

Ce sont des lymphocytes granuleux dont l'activité est indépendante de celle du complément. Toutefois, ils expriment à leur surface un récepteur au fragment Fc des IgG, le CD16. Si la cellule NK interagit avec un anticorps ayant fixé une bactérie, il en découle l'exocytose de granules bactéricides ainsi que la libération de cytokines.

- *Les cellules épithéliales*

Les cellules épithéliales participent à la protection de la mamelle ; ce ne sont cependant pas des cellules spécialisées dans les mécanismes de défense. Elles expriment à leur surface certains TLRs et sont donc capables de reconnaître les MAMPs exposés à la surface des agents pathogènes comme les bactéries. Les cellules épithéliales ne peuvent pas reconnaître le LPS car elles ne produisent pas la molécule CD14, indispensable à sa détection ; cependant la quantité de CD14 soluble dans le lait est suffisante pour permettre cette détection et la production de cytokines.

Les cellules épithéliales produisent de nombreux peptides, protéines et lipides à activité antimicrobienne telles que des cytokines, des chimiokines, la xanthine oxydase et des sphingolipides (Rainard et Riollet, 2006).

- ❖ Immunité humorale

- *Les peptides antimicrobiens (AMPs)*

- La lactoferrine

La lactoferrine est une protéine glycosylée capable de chélater le fer en fixant deux ions  $Fe^{2+}$ . Cette liaison est réversible et fonction du pH. En chélatant le fer, cet élément n'est plus disponible pour le développement des bactéries. Cela confère à la protéine une propriété bactériostatique mais aussi une protection contre les radicaux libres catalysés par le fer. La lactoferrine peut aussi capter d'autres ions métalliques tels que le  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  mais avec

une moindre affinité. Ainsi elle agit contre la plupart des bactéries, *E. coli* étant particulièrement sensible à son action.

Le lait de vache contient 20 à 200 µg/ml de lactoferrine. Cette concentration est faible, en comparaison de celle mesurée dans le lait humain (1-2 mg/ml) (Rainard et Riollet, 2006). La concentration de lactoferrine augmente 24 à 48 heures après le tarissement ou quand la production laitière diminue. La lactoferrine est aussi contenue dans les granules secondaires des neutrophiles et elle représente jusqu'à 5% de la lactoferrine totale lors d'inflammation de la glande mammaire. L'IL-8 peut aussi stimuler la production de lactoferrine.

Les rôles de la lactoferrine sont les suivants :

- Des propriétés bactériostatiques car elle entre en compétition avec les bactéries dans l'utilisation du fer. Cette propriété est d'autant plus importante lors du tarissement. Son action est beaucoup moins efficace durant la phase colostrale et la lactation car la concentration de lactoferrine est plus faible. Toutefois, certaines bactéries sont capables de contourner cette propriété. En effet, certaines peuvent fixer la lactoferrine, ce qui permet l'acquisition du fer par la bactérie. Certaines bactéries produisent des sidérophores dont la capacité de chélation du fer est plus élevée que celle de la lactoferrine pour un transfert aux bactéries.
- Des propriétés bactéricides car la lactoferrine peut fixer le LPS, à l'acide lipotéichoïque, molécule de la paroi des bactéries à Gram positif et les porines. Ceci déstabilise, fragilise et augmente la perméabilité de la membrane bactérienne. Elle permet la libération d'une protéine bactériolytique, la lactoferricine.
- Des propriétés anti-oxydantes suite à la libération par les macrophages après une activation par le LPS, le TFN- $\alpha$ , ou des réactifs oxygénés. Ces derniers étant cytotoxiques, la lactoferrine limite leurs effets néfastes sur les membranes cellulaires de la glande mammaire.
- Des propriétés immunomodulatrices en limitant la granulopoïèse et contrôlant la production de neutrophiles.
- Des propriétés anti-inflammatoires car la lactoferrine du lait va interagir avec la protéine A du LPS et de nombreux récepteurs exposés à la surface des cellules épithéliales et immunitaires. Ceci va aboutir à une variation de la production de

cytokines ou du recrutement des cellules de l'inflammation comme les leucocytes et ainsi protéger la mamelle d'une inflammation aiguë (Pierce et al, 2009).

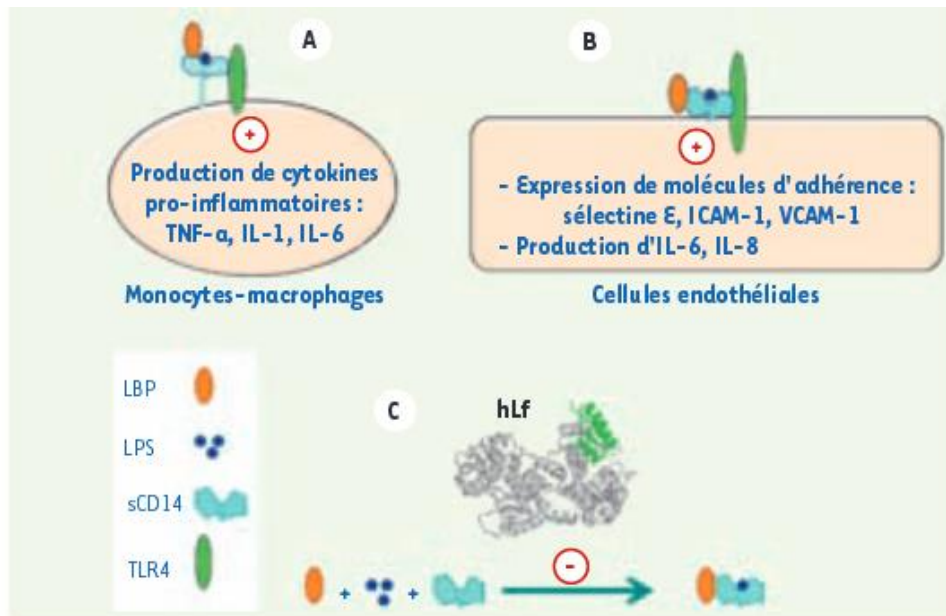


Figure 10 : La neutralisation du LPS par la lactoferrine protège d'une inflammation aiguë. Les LPS libérés dans la circulation sanguine s'associent à la LBP (LPS-Binding Protein) et au récepteur CD14 présent sur les monocytes et les macrophages.

A : l'activation de ces cellules nécessitera l'interaction du complexe ternaire avec le récepteur TLR4.

B : Les cellules endothéliales dépourvues de CD14 seront activées par la présentation au TLR4 du complexe LPS-LBP-CD14 soluble. Le CD14 soluble est produit soit par les cellules activées, soit par clivage enzymatique du CD14 membranaire. L'activation des monocytes/macrophages et des cellules endothéliales conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires. Produites en quantités modérées, ces molécules ont un effet bénéfique mais, lorsque leur production est excessive, il en résulte des altérations tissulaires pouvant conduire au choc septique. L'action de ces cytokines sur les cellules endothéliales conduit également à une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion dont les ligands sont portés par les neutrophiles et les monocytes. L'adhésion des neutrophiles, suivie de leur dissémination dans les tissus, joue un rôle majeur dans le processus inflammatoire.

C : La lactoferrine, piégeant le LPS, inhibe la formation de différents complexes et s'oppose aux effets délétères du LPS, offrant ainsi une protection contre une inflammation aiguë.

→ Des propriétés pro-inflammatoires : la lactoferrine stimule la maturation et la différenciation des lymphocytes T, la phagocytose des cellules de l'immunité, la production d'IFN- $\gamma$  et d'interleukines.

➤ La transferrine

La transferrine est une protéine ayant une activité bactériostatique en permettant elle aussi de capter le fer. N'étant pas synthétisée dans la glande mammaire, elle provient du sang à l'état basal mais surtout de l'exsudation du plasma en cas d'inflammation. Elle agit plus rapidement que la lactoferrine (Rainard et Riollet, 2006).

➤ Les défensines

Les défensines sont produites par les granulocytes. Elles sont efficaces contre *S. aureus* et *E. coli* (Strandberg et al, 2005). De plus, elles ont une activité chimiotactique qui favorise le recrutement des cellules immunitaires.

➤ Les cathélicidines

Les cathélicidines sont exprimées dans les leucocytes comme les neutrophiles, les monocytes/macrophages, les cellules NK, les lymphocytes T et B. Les cathélicidines sont des constituants majeurs des granules spécifiques des neutrophiles qui, une fois libérées, ont des propriétés antimicrobiennes. De plus, les cathélicidines sont capables de neutraliser le LPS en empêchant sa liaison au CD14 (Zanetti 2005).

▪ *Le système du complément*

Le système du complément participe aussi à la défense du tissu mammaire en reconnaissant les agents pathogènes et grâce à son activité cytolytique. Sa présence en faible concentration dans le lait des glandes saines a été décrite. Trois voies permettent d'activer le complément : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. Ces dernières aboutissent toutes à la formation de la convertase C3. Cette enzyme clive le C3 en C3a et C3b. C3a possède un fort pouvoir chimio-attractif des cellules inflammatoires. Le rôle de C3b se situe à la surface des

cellules cibles où il permet la reconnaissance des bactéries par les cellules responsables de la phagocytose (GNN et macrophages).

Au niveau de la mamelle, la voie classique est moins probable du fait de l'absence en quantité détectable du marqueur C1q capable de reconnaître un site du fragment Fc des différentes immunoglobulines (IgM, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> et G<sub>3</sub>) (Caroll et Sim, 2011).

La voie alterne quant à elle joue un rôle important. Elle est la principale voie d'activation du complément de la réponse innée, car elle ne nécessite pas d'opsonine. La molécule C3b est nécessaire pour cette voie. En effet, elle se lie par une liaison covalente après la reconnaissance de certains sucres ou acides aminés à la surface de l'agent. Une fois la liaison mise en place, s'en suit une cascade d'activation permettant la génération d'une molécule de C5a ayant une activité pro-inflammatoire. Elle est chimioattractive et permet ainsi la diapédèse des GNN à travers l'épithélium mammaire (Caroll et Sim, 2011). Ce fragment atteint rapidement de fortes concentrations lors d'infection à *E. coli* contrairement aux infections à *S. aureus* (Rainard et Riollet, 2006).

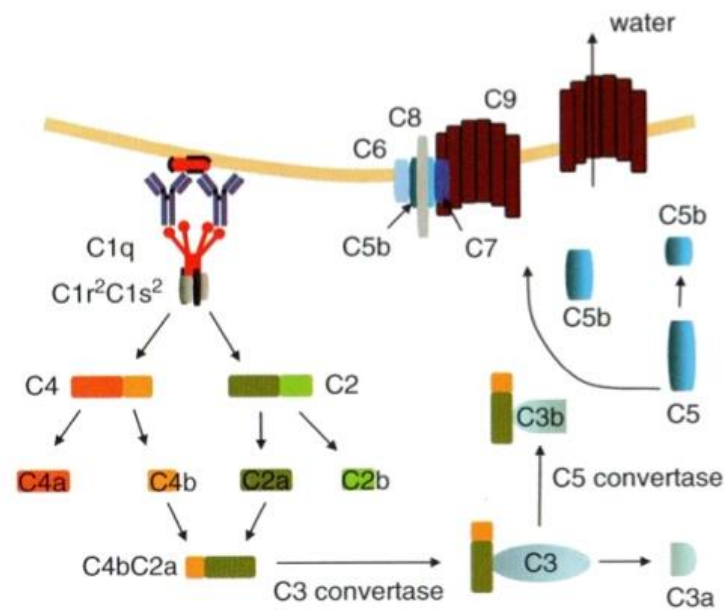


Figure 11 : Voie classique d'activation du complément (Williams, 2012).

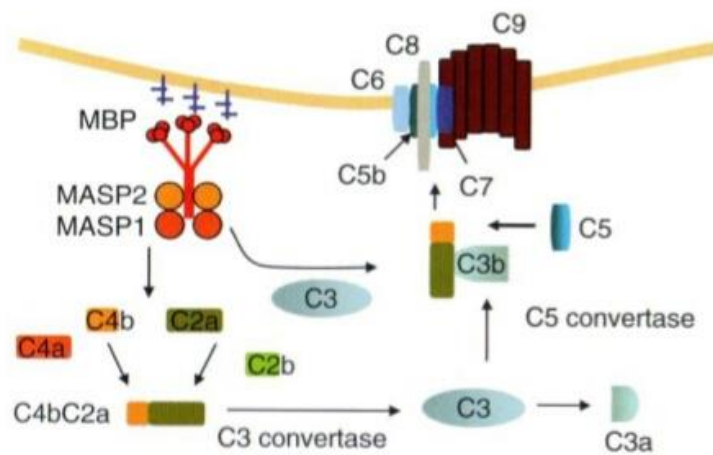


Figure 12 : Voie alterne d'activation du complément (Williams, 2012).

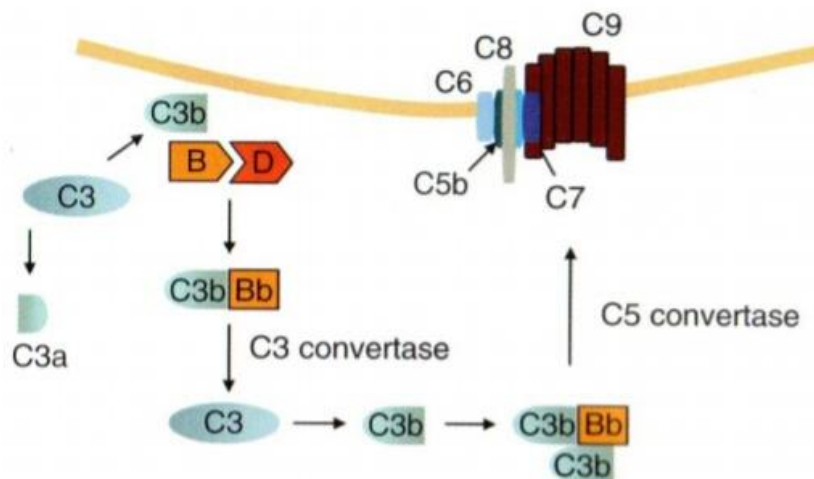


Figure 13 : Voie des lectines pour l'activation du complément (Williams, 2012).

- Les anticorps naturels

Les anticorps naturels sont produits en l'absence de stimulation antigénique externe. La concentration de ces anticorps est élevée dans les sécrétions mammaires pendant la période sèche, et très élevées dans le colostrum permettant ainsi le transfert d'immunité au nouveau-né. Cependant la concentration est beaucoup plus faible dans le lait. Elle est suffisante en début de lactation et aide à la réponse vis-à-vis d'*E. coli*, mais elle diminue au fur et à mesure que la lactation progresse.



Tableau 9 : Concentration des différentes immunoglobulines dans le lait (Buter et al, 1981).

Nature de l'immunoglobuline	Concentration en mg/ml de lait
IgG1	0,60
IgG2	0,05
IgM	0,04
SIgA	0,13

La faible concentration des IgG2 et aussi des IgM conduisent à une faible opsonisation des bactéries pathogènes. Mais lors d'inflammation, l'exsudation plasmatique permet de fournir suffisamment d'anticorps pour optimiser la fonction d'opsonisation.

- *Les protéines de la phase aiguë*

Deux protéines sont produites par la mamelle : la SAA3 (Sérum Amyloid A3) et l'haptoglobine. Pour la SAA3, la synthèse par les cellules épithéliales est possible dans les conditions physiologiques, mais elle augmente fortement à la suite d'une stimulation par le LPS, notamment dans les tissus alvéolaires, ductal et cisternal. La SAA possède des propriétés antibactériennes contre *E. coli* (Ceciliani et al 2012). De plus, elle agit comme une molécule chimiotactique et stimule la migration, l'adhésion et l'infiltration tissulaire des monocytes et des GNN.

L'haptoglobine, quant à elle, n'est pas synthétisée par la mamelle saine. En effet, la stimulation de LPS est nécessaire à la production d'haptoglobine qui n'a lieu que dans les régions alvéolaires (Rainard et Riollet, 2006).

Ces deux protéines sont produites en grandes quantités par les hépatocytes au cours de l'inflammation aiguë. Outre la source mammaire de SAA (aussi appelée MAA), il existe donc une source hépatique et plasmatique qui peut diffuser dans le parenchyme mammaire lors d'inflammation.

- *Les composants chimiques*

La lactoperoxydase est une enzyme qui en présence de thiocyanate et de peroxyde d'hydrogène est capable d'inhiber et d'éliminer les bactéries responsables de mammites. Le

lait de vache contient environ 30µg de peroxydase/ml. Les concentrations de thiocyanate varient en fonction de l'alimentation de l'animal. De plus, la faible concentration en oxygène dans le lait semble diminuer l'efficacité contre les agents responsables de mammites (Rainard et Riollet, 200).

La xanthine oxydase est une enzyme constituante de la membrane des globules gras du lait. Elle est capable de catalyser la formation d'oxyde nitrique à partir de nitrite inorganique dans les conditions aérobies. Ceci aboutit à la formation du peroxy-nitrite qui est un puissant agent bactéricide. Le lait de vache, qui possède une activité xanthine oxydase marquée, est bactériostatique pour *E. coli* après ajout de nitrite. L'activité xanthine oxydase est favorisée par une faible concentration en oxygène et par un pH inférieur à 7. Le nitrite peut être produit par la bactérie elle-même ou bien par la NOS (Rainard et Riollet, 2006).

#### 3.2.2.2. Immunité acquise

L'immunité acquise fait intervenir les lymphocytes T et B dont l'activité est sous l'influence et le contrôle de diverses cytokines (Burvenick et al, 1994).

#### ❖ Les lymphocytes

Les lymphocytes sont des cellules capables de reconnaître les antigènes grâce à des récepteurs membranaires spécifiques de motifs exprimés à la surface de l'agent pathogène pour les lymphocytes B ou après apprêtage des antigènes protéiques par les cellules présentatrices d'antigènes pour les cellules T.

Dans une mamelle saine, ce sont les lymphocytes T qui représentent la majorité des lymphocytes présents (Sordillo et al, 1997).

▪ *Les lymphocytes T*

Les lymphocytes T peuvent être subdivisés en deux groupes :

- les lymphocytes T $\alpha\beta$  comprenant les lymphocytes exprimant CD4 (cellules T auxiliaires) et les lymphocytes CD8 (cellules T cytotoxiques ou T supresseurs).
- les lymphocytes T $\gamma\delta$  qui reconnaissent directement les phosphoantigènes

Le pourcentage de ces deux groupes varie en fonction de la localisation tissulaire et du stade de lactation (Sordillo et al, 1997).

*Tableau 10 : Type cellulaire selon la santé de la mamelle (Asai et al, 1998).*

Etat de la mamelle	Type cellulaire
Mamelle saine	T $\alpha\beta$ type CD8 <sup>+</sup>
Mamelle infectée	T $\alpha\beta$ type CD4 <sup>+</sup>

*Tableau 11 : Rapport CD4/CD8 dans le lait d'une mamelle selon les différents stades physiologiques (Asai et al, 1998).*

Rapport CD4/CD8 dans une mamelle saine, CD4/CD8 > 1 dans le sang (Asai et al, 1998)	
Stade physiologique	Rapport CD4/CD8
Lactation	<1
Tarissement	>1
Période sèche	>1
Avant parturition	<1

Les lymphocytes CD4<sup>+</sup> produisent des cytokines à la suite de la reconnaissance du complexe Ag-CMH de classe II présent sur les CPA comme les lymphocytes B ou les macrophages. Les lymphocytes CD4 permettent aussi l'activation des lymphocytes B et des macrophages par l'intermédiaire de cytokine (Sordillo et al, 1997).

Les lymphocytes CD8<sup>+</sup>, quant à eux, ont un rôle cytotoxique ou suppresseur. Les lymphocytes T cytotoxiques sont capables de reconnaître l'antigène présenté aux cellules par l'intermédiaire de molécules du CMH de classe I et exprimé à la surface des cellules infectées. Les lymphocytes T cytotoxiques détruisent les cellules infectées à la suite d'une interaction de surface ou la libération de perforines et de granzymes (Taylor et al, 1994).

Les lymphocytes T suppresseurs peuvent contrôler et moduler la réponse immunitaire.

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> isolés après la mise bas appartiennent à la catégorie des cellules suppressives, alors que ceux isolés en milieu et en fin de gestation sont plutôt de type cytotoxique (Sordillo et al, 1997).

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  ont un rôle cytotoxique sans implication du complexe Ag-CMH. Ils constituent eux aussi une ligne de défense contre les infections bactériennes (Sordillo et al, 1997) en détruisant les cellules épithéliales (Mackay et Hein, 1989). De plus, ils modulent l'inflammation et augmentent l'efficacité de la réparation tissulaire. Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  diminuent l'intensité des réponses issues de l'activation des lymphocytes T  $\alpha\beta$ .

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires produisent de l'IL-17 (Th17) et/ou de l'IFN- $\gamma$ .

#### ▪ *Les lymphocytes B et les immunoglobulines (Ig)*

Le premier rôle des lymphocytes B est de produire des immunoglobulines à la suite de la reconnaissance d'un antigène spécifique par leur récepteur de surface, qui est la même immunoglobuline que celle qui sera produite après l'étape de maturation en plasmocytes. Une fois l'antigène reconnu, il est internalisé et présenté en association avec les molécules du CMH de classe II aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Ces derniers vont alors induire la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes qui sont capables de produire de grandes quantités d'anticorps ou de se différencier en cellules mémoires (Sordillo et al, 1997).

Les lymphocytes B peuvent aussi être activés de façon non spécifique par des MAMPs comme le LPS.

Contrairement aux lymphocytes T, la proportion de lymphocytes B par rapport à la population totale reste à peu près constante au cours de la lactation (Shafer-Weaver et al, 1996). Leur proportion n'augmente pas dans le lait lors d'infection mammaire (Riollet et al, 2000).

Il existe quatre classes d'immunoglobulines qui sont présentes dans le lait et qui peuvent jouer un rôle lors d'infection mammaire : IgG1, IgG2, IgM et IgA (Sordillo et al, 1997).

L'isotype  $\gamma 1$  est le type dominant dans le colostrum bovin. La concentration des immunoglobulines varie en fonction du stade de lactation et du statut infectieux de la glande mammaire. Le type  $\gamma$  est prédominant dans les sécrétions lactées de la glande saine. Toutefois, la concentration des Ig dans le lait augmente à la suite d'une mammite. En effet, en cas d'inflammation, les neutrophiles sont capables d'emporter des IgG2 avec eux vers la glande mammaire (Sordillo et al, 1997). Les IgG1, IgG2 et IgM peuvent aussi jouer le rôle d'opsonines et donc favoriser la phagocytose par les neutrophiles et les macrophages. Les anticorps peuvent se lier directement à la bactérie ou par l'intermédiaire du facteur C3b du complément. Les IgA, quant à elles, empêchent la colonisation bactérienne par défaut d'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales mammaires et neutralisent les toxines, mais leur concentration est faible dans le lait de vache par rapport à celui d'autres espèces (Sordillo et al, 1997).

Les IgA et IgM sont aussi synthétisées localement dans la glande mammaire. Les IgG1 arrivent depuis le sang de façon active après translocation permise par le récepteur FcRn contrairement aux IgG2 qui sont transportées passivement en même temps que les neutrophiles.

#### ▪ *Le rôle des cytokines*

Les cytokines sont des protéines produites spontanément qui participent aux deux types d'immunité. Parmi les cytokines, on distingue :

##### ➤ Les interleukines (IL)

L'IL-2 produite par les lymphocytes T auxiliaires amplifie la réponse immunitaire des lymphocytes T et favorise la transition vers le phénotype mémoire (Sordillo et al, 1997). Elle permet aussi la croissance et la différenciation des lymphocytes B, activent les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques (Magnuson et al, 1987).

Les IL-4, -5 et -10 agissent sur les cellules B et favorisent les réponses immunitaires humorales (Shafer-Weaver et al, 1999).

L'IL-17 entraîne la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  et des chimiokines (Leug-Theug-Long et Guerder, 2008).

➤ Les interférons (IFN)

Il existe deux types d'interférons :

- les interférons de type 1 avec l'IFN- $\alpha$  et l'IFN- $\beta$
- un interféron de type 2 qui est l'IFN- $\gamma$ .

L'IFN- $\gamma$  est une protéine produite par les lymphocytes T à la suite d'une stimulation antigénique. Elle augmente l'activité des cellules NK et celle des lymphocytes T cytotoxiques. Cette protéine stimule aussi la synthèse et la libération des formes réactives de l'oxygène par les macrophages et les neutrophiles (Sordillo et al, 1997).

➤ Les TNF (tumor necrosis factor)

Parmi les cytokines inflammatoires produites durant la phase aiguë de la réaction inflammatoire, le TNF- $\alpha$  est primordial dans le développement du choc endotoxique qui apparaît parfois à la suite d'une mammite coliforme aiguë. En 1995, Sordillo et son équipe ont démontré que les monocytes isolés chez les vaches en péri-partum produisaient plus de TNF- $\alpha$  à la suite d'une stimulation par le LPS que des cellules isolées de vaches en milieu ou en fin de lactation. Ainsi une augmentation de la production de TNF- $\alpha$  par les cellules autour de la mise bas peut expliquer la plus grande fréquence de mammites coliformes avec des signes cliniques lors de cette période (Sordillo et Streicher, 2002).

Lors d'une infection mammaire, les cytokines sont produites en grande quantité. Elles permettent la migration des neutrophiles jusqu'au site de l'infection (Kobayashi, 2008). Les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , et l'IL-8, agissent sur les neutrophiles pour provoquer le chimiotactisme. Elles entraînent aussi une augmentation de l'activité bactéricide et de la phagocytose des neutrophiles en augmentant l'expression des récepteurs Fc à la surface cellulaire (Sordillo et Stericher, 2002).

Les signes généraux sont dus à la libération de médiateurs de l'inflammation tels que IL-6, INF- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ . Ces derniers agissent sur le foie qui sécrète les protéines de la phase aiguë de l'inflammation. De plus, ce sont aussi ces médiateurs, qui en agissant sur le système nerveux central, sont responsables de la fièvre. Cette dernière s'accompagne généralement d'une accélération du rythme cardiaque et respiratoire.

#### 3.2.2.3. Lien entre LPS, TLR et NO

Le LPS en tant que MAMP est reconnu par le TLR4 qui fait partie des PRRs. Toutefois, cette reconnaissance ne peut se faire sans l'intervention de deux autres protéines de surface MD2 et CD14. Le CD14 lie le LPS tandis que MD2 lie le TLR4. Ces deux complexes sont donc nécessaires pour qu'il y ait reconnaissance et liaison entre le TLR4 et le LPS. Cette interaction permet alors d'activer le facteur NF $\kappa$ B et ainsi libérer des cytokines (Charles et al, 2002) Durant les mammites coliformes ou suite à une injection de LPS, les IL-1,-6 et -8, des prostaglandines, le PAF, le facteur C5 du complément et le NO sont libérés localement. De plus, une augmentation de la concentration du TNF- $\alpha$  est observée dans le lait suite à une infection par *E. coli*. Toutefois, cette augmentation apparaît plus rapidement lors d'une mammité provoquée par du LPS qu'avec *E. coli* ; le pic est cependant plus marqué lors de mammité coliforme. Il a été démontré que la quantité de TNF- $\alpha$  libéré est positivement corrélée à la sévérité de la mammité (Hoeben et al, 2000).

Le LPS et les cytokines produites stimulent la synthèse de NO par les macrophages. L'augmentation de TNF- $\alpha$  est suivie par une augmentation différée de NO $_x$  (NO $_2$  + NO $_3$ ). Il semble que les cas sévères de mammites coliformes s'accompagnent de concentrations plasmatiques élevées de TNF- $\alpha$  et de NO $_x$ . L'augmentation des concentrations de TNF- $\alpha$  et de NO $_x$  est initiée par la présence de LPS (Blum et al, 2000).

#### 3.2.2.4. La perméabilité de la mamelle

L'épithélium qui sépare la citerne de l'espace interstitiel est imperméable durant la lactation, grâce aux jonctions serrées entre les cellules épithéliales, et constitue une véritable barrière entre le lait et le liquide interstitiel. Toutefois cette barrière est moins étanche hors lactation,

ce qui autorise le passage de certaines molécules telles que l'albumine sérique ou les immunoglobulines (Nguyen et Neville, 1998).

Lors de mammite, la perméabilité est fortement augmentée. Ainsi il existe un flux bidirectionnel de molécules, soit des composants du lait vers le reste de l'organisme (par exemple, le lactose), soit du sang vers le lait (par exemple, l'albumine sérique). Cette augmentation de la perméabilité joue donc un rôle important pour la mise en place de l'immunité car elle permet d'amener jusqu'à la glande mammaire, les différents composants de l'immunité humorale et cellulaire.

Deux mécanismes sont responsables de l'augmentation de la perméabilité membranaire lors de mammites :

→ les bactériotoxines

→ les médiateurs pro-inflammatoires tels que l'histamine, le TNF- $\alpha$  et l' IFN- $\gamma$

Ainsi la concentration de BSA (sérum-albumine bovine) est fréquemment mesurée dans le lait et est considérée comme un marqueur de l'exsudation plasmatique et donc de l'augmentation de la perméabilité hémato-mammaire.

Dans le lait d'une glande saine, la concentration de BSA est d'environ 0,2 mg/ml contre 40-45 mg/ml dans le plasma. La BSA provient en partie du sang mais semblent aussi pouvoir être sécrétée par les cellules épithéliales mammaires (Shamay et al, 2005).

L'augmentation de la concentration de BSA dans le lait est rapide lors de mammite clinique et coïncide avec la diapédèse des GNN (Shuster et al, 1997).

L'exsudation plasmatique permet le transport des différents effecteurs de l'immunité humorale tels que les anticorps ou les facteurs du complément.

De plus, elle apporte dans le lait de nombreux composants sanguins participant aux défenses de la mamelle. La concentration dans le lait de certains de ces composants comme la transferrine ou les protéines de la phase aiguë augmente ainsi assez fortement lors de mammite (Eckersall et al, 2001 ; Rainard, 1983).



## 4. Traitement et mesures préventives

### 4.1. Traitement curatif

#### 4.1.1. Traitement antibiotique

##### 4.1.1.1. Principes généraux

Pour le traitement des mammites à *E. coli*, l'application d'antibiotique par voie intramammaire ou par voie systémique n'est pas obligatoire en raison de la faible durée de l'infection et du taux élevé de guérison spontanée (Smith et al, 1985). Ainsi, la question de l'utilité du traitement antibiotique est effectivement posée. La guérison bactériologique lors de mammites colibacillaires est estimée à 90% en l'absence d'administration antibiotique grâce à une réponse inflammatoire et immunitaire, qui sont dans la majorité des cas, efficaces et suffisantes.

Les vaches atteintes d'une mammite clinique avec des symptômes légers voire modérés sont capables de lutter seules contre cette infection.

Les seuls cas pour lesquels l'antibiothérapie semble alors indiquée sont les cas de mammites cliniques sévères. En effet, si l'état général clinique est altéré avec de la fièvre, une baisse marquée de l'appétit, deux voies d'administration (intra-mammaire et systémique) des antibiotiques sont alors recommandées. Le traitement parentéral a pour objectif de limiter la bactériémie qui est fréquente dans ces cas.

A l'heure actuelle, la question d'une antibiothérapie raisonnée reste très présente. Dans certains cas, l'identification du germe responsable de l'affection est nécessaire afin de pouvoir prescrire et administrer un antibiotique inscrit dans la liste dites des antibiotiques critiques. Or la culture bactérienne à partir d'un échantillon de lait et la réalisation éventuelle d'un antibiogramme nécessitent plusieurs heures à plusieurs jours ; cette procédure est donc incompatible avec la prise en charge rapide d'une mammite aiguë. De plus, les chances de guérison augmentent avec la précocité du traitement. Ainsi un des schémas proposés est de traiter la vache présentant une mammite aiguë avec un traitement de première intention qui sera déterminé en fonction de la sévérité des signes cliniques et de l'épidémiologie (âge de l'animal, stade de lactation...). Avant de mettre en place ce traitement, un échantillon de lait

doit être prélevé et envoyé pour culture afin de confirmer ou d'ajuster le traitement et ainsi d'éviter au maximum les échecs thérapeutiques.

Deux points importants sont à prendre en considération lors du traitement anti-infectieux : la dose et la durée du traitement. En effet, la concentration de l'antibiotique doit être supérieure à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) dans la mamelle et le lait. Cependant, les CMI indiquées sont celles des molécules dans le sang. Ainsi, ces valeurs sont parfois plus élevées dans le lait. Toutefois, l'inflammation de la mamelle diminue l'intégrité de la barrière épithéliale, facilitant la diffusion de certaines molécules dans le lait, et modifie également le pH du lait (qui est plus basique) à la suite du changement de sa composition. La diffusion des antibiotiques dans le lait peut s'avérer plus compliquée avec pour conséquence, une efficacité moindre.

#### 4.1.1.2. Applications

Les principales molécules utilisées en première intention appartiennent à la famille des Pénicillines A comme l'amoxicilline ou l'ampicilline (Bergonier, 2014).

Toutefois, le choix de l'oxytétracycline, des triméthoprime-sulfaméthoxazole peut être judicieux pour traiter les vaches atteintes d'une mammite colibacillaire (Wagner et Erksine 2006).

Les céphalosporines de seconde et de troisième générations telles que le Ceftiofur ou la Cefquinome ont été montrées efficaces contre les *E. coli*. En outre, plusieurs fluoroquinolones (Danofloxacin, Enrofloxacin, Marbofloxacin) possèdent une AMM pour le traitement par voie systémique des mammites colibacillaires aiguës. L'action de ces dernières est concentration-dépendante et elles ont un pouvoir bactéricide limitant la croissance bactérienne et par conséquent la quantité de LPS produit. Lors de traitement avec des fluoroquinolones, les signes cliniques régressent plus rapidement qu'en l'absence de traitement.

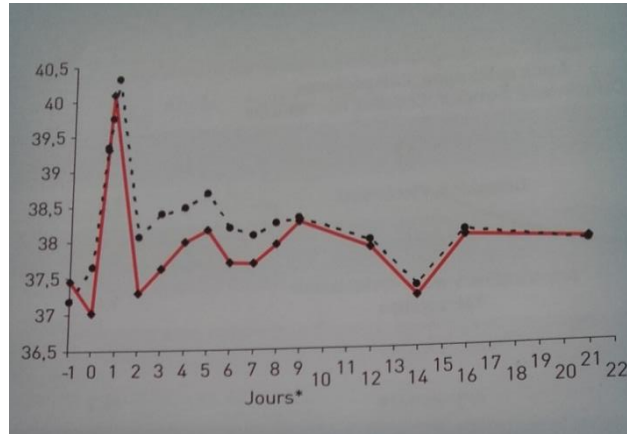


Figure 14 : Evolution de la température rectale lors de mammites expérimentales à *E. coli* (Vaches traitées par voie systémique avec une fluoroquinolone ; - - - Vaches non traitées) (Poutrel, 2008).

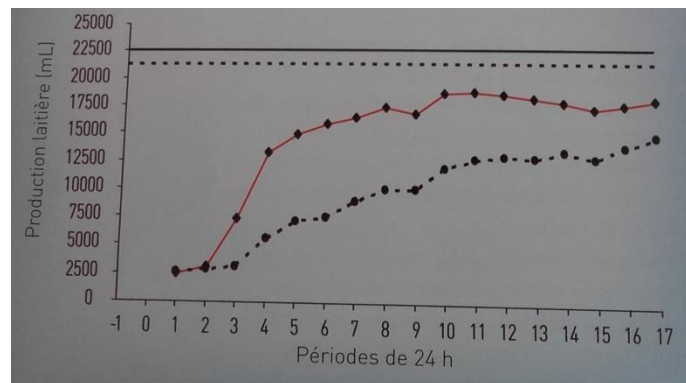


Figure 15 : Evolution de la production laitière, ml lors de mammites expérimentales à *E. coli* (— Vaches traitées par voie systémique avec une fluoroquinolone ; - - - Vaches non traitées) (Poutrel, 2008).

De nouvelles mesures visant à prévenir l'antibiorésistance ont été édictées. L'utilisation de ces antibiotiques dits critiques est soumise à une nouvelle réglementation, la réalisation d'un antibiogramme devant justifier la mise en place d'un traitement avec ces molécules.

#### 4.1.2. Résistance aux antibiotiques

La sensibilité des isolats d'*E. coli* vis-à-vis des antibiotiques semble, d'après les tests et mesures réalisés *in vitro*, relativement bonne.

Plusieurs études ont été menées sur la résistance des *E. coli* à divers antibiotiques. Les résultats diffèrent selon les auteurs et les pays car, bien entendu, les isolats d'*E. coli* sont différents d'une étude à l'autre.

L'étude menée par Suojala et son équipe, à partir de 154 isolats d'*E. coli* obtenus à partir de vaches avec une mammites clinique dans 65 élevages laitiers du sud de la Finlande, a montré que 27,8% et 20,1% des *E. coli* sont résistants respectivement à au moins un, voire deux antibiotiques.

Une autre étude, américaine (Srinivasan et al, 2007), a porté sur l'antibiorésistance de 135 isolats d'*E. coli* obtenus à partir de mammites bovines, représentant 85 profils génétiques différents. Les résultats sont donnés dans le tableau 12.

L'équipe de Saina a étudié la résistance aux antibiotiques de 399 isolats d'*E. coli* issus de mammites subcliniques ou cliniques dans 89 élevages laitiers à travers 6 provinces canadiennes. Ils ont démontré que 4% des isolats étaient résistants à au moins un antibiotique. De plus, le pourcentage de résistance diffère d'une province à l'autre. Par exemple, 23,6% des *E. coli* sont résistants aux tétracyclines dans la province de l'Alberta contre 9,5% en Ontario, et 10,4% au Québec.

Enfin, Botrel et son équipe ont publié les résultats concernant les pourcentages de résistance aux antibiotiques de 79 isolats d'*E. coli* issus de mammites cliniques en Rhône-Alpes.

*Tableau 12 : Bilan des pourcentages de résistance de certains antibiotiques lors de mammites à E. coli obtenus dans quatre études.*

Antibiotiques	Pourcentage de résistance (Suojala et al, 2011)	Pourcentage de résistance (Srinivasan et al, 2007)	Pourcentage de résistance (Saina et al, 2012)	Pourcentage de résistance (Botrel et al, 2008)
Ampicilline	18,6%	98,4%	8,2%	/
Amoxicilline	/	/	/	15,2%
Spectromycine	16,4%	40,3%	8,7%	30,4%
Tétracycline	15,7%	24, 8%	14,7%	7,6%
Sulfamides	13,6%	/	/	1,3%
Gentamicine	0%	/	/	0%
Florfénicol	0%	/	/	2,5%
Ceftiofur	0%	/	/	/
Sulfisoxazole	/	34,1%	9,2%	/
Ceftriaxone	/	/	0%	/
Ciprofloxacine	/	/	0%	/
Cefquinome	/	/	/	0%
Colistine	/	/	/	0%
Kanamycine	/	/	/	8,9%

Bien que les différentes études montrent des différences de valeurs pour la résistance d'un antibiotique donné, les tétracyclines et les triméthoprime-sulfaméthoxazoles semblent être efficaces lors de ces mammites colibacillaires.

#### 4.1.3. Traitement complémentaire

Le traitement des mammites aiguës ou suraiguës repose sur des traitements de support avec la mise en place d'une fluidothérapie, d'administration d'anti-inflammatoires, une vidange de la mamelle plus fréquente ou encore des injections d'ocytocine.

La fluidothérapie permet de limiter les effets négatifs dus à la libération d'endotoxines comme le choc, la déshydratation ou la diarrhée. En général, une solution hypertonique salée (NaCl 7,2%) est perfusée à raison de 2 à 3 litres. Une perfusion plus lente de 20 à 60 litres de soluté isotonique de lactate de Ringer ou de NaCl 0,9% peut être administrée si l'animal ne s'abreuve pas correctement. Toutefois, une réhydratation par voie orale est aussi possible par drenchage de 30 à 50 litres d'eau, éventuellement additionnée de sels (Rémy, 2010).

Concernant le traitement anti-inflammatoire, les molécules plus couramment employées sont les glucocorticoïdes et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Néanmoins, les glucocorticoïdes entraînent une modification de l'immunité cellulaire en réduisant l'afflux neutrophilique, ainsi qu'une diminution de la production laitière. Les AINS sont donc souvent privilégiés par rapport aux AIS. De plus, il faut veiller à l'absence de déshydratation avant l'administration d'AINS pour réduire le risque d'ulcères digestifs (qui est faible chez les bovins), et d'insuffisance rénale ou hépatique. L'intérêt des anti-inflammatoires en application locale est discuté. Il existe des spécialités qui associent un anti-inflammatoire avec un ou des antibiotiques à administrer par voie locale. Par contre, la voie générale semble devoir être privilégiée. En inhibant la cyclo oxygénase COX 2, les AINS diminuent la synthèse de thromboxanes et de prostaglandines, produits de l'acide arachidonique. Une étude menée par Shpigel a démontré que les vaches avec une mammite clinique due à un coliforme et traitées avec une association TMP-sulfamides et kétoprofène avaient 2,6 et 6,0 fois plus de chance de retrouver une production laitière supérieure ou égale à 75% de la production avant la mammite, par rapport à celles traitées seulement avec des antibactériens.

Il est aussi conseillé de vidanger la mamelle jusqu'à 10 fois par jour afin d'éliminer les sécrétions anormales, les bactéries et les médiateurs de l'inflammation (Berthelot et Bergonier, 2006). L'utilisation d'ocytocine à des doses élevées soit 80 à 100 UI par vache est préconisée par certains auteurs pour aider la vidange. Toutefois, aucune étude ne prouve qu'elle améliore la guérison (Durel et al, 2004).

#### 4.1.4. Prévention et mesures d'hygiène

*E. coli* étant présente dans l'environnement d'élevage, l'hygiène au moment de la traite est importante dans la mesure où elle permet l'élimination des souillures qui sont la source des contaminations mammaires. Tout d'abord, le nettoyage de la mamelle avant la traite peut être réalisé à l'aide de lavettes individualisées ou une douchette. Ensuite l'étape de pré-trempage a pour objectif de désinfecter et de prévenir de nouvelles infections dues aux bactéries environnementales qui colonisent les trayons entre les traites. Le produit de pré-trempage, bien qu'il ait une action rapide, doit avoir un temps de contact minimal avec le trayon pour être efficace (30 secondes au minimum). L'efficacité préventive du pré-trempage est de 18 à 40% de nouvelles infections en moins quel que soit le type de bactéries (Bergonier, 2014). Le pré-trempage est d'autant plus efficace qu'il s'agit de germes d'environnement. En effet, Pankey a démontré que l'utilisation de solutions de pré-trempage composées de 0,1 à 0,25% d'iode réduisait de 51% les infections mammaires dues à des germes environnementaux au cours d'une étude dans quatre exploitations laitières. Les bactéries coliformes ne sont pas tolérantes ou résistantes aux désinfectants actuellement utilisés dans ce cadre.

Concernant le trempage après la traite ou post-trempage, il est surtout actif sur les germes contagieux responsables des mammites dites de traite, mais il n'est pas efficace sur les germes environnementaux (Bushnell, 1984 ; Fagundes et al, 2012). En effet, ces produits germicides sont capables de détruire les bactéries coliformes mais leur efficacité reste de courte durée. Les coliformes colonisent la peau du trayon à partir de l'environnement entre les traites soit au moment où l'activité du produit de post-trempage a déjà fortement diminuée (Pankey et al, 1984). L'utilisation de produits avec une forte activité rémanente et un pouvoir barrière est recommandée pour la prévention des mammites dont la source est environnementale.

Enfin, empêcher les vaches de se coucher directement après la traite, en les incitant à aller s'alimenter par exemple, évite que les trayons soient en contact avec la litière avant que le sphincter ne soit fermé (Bartlett et al, 1992).

#### 4.2. Traitement préventif des infections de la période sèche

Les traitements à la fin de la lactation permettent d'éliminer les infections acquises et de protéger la glande mammaire vis-à-vis de nouvelles infections qui pourraient être contractées au cours de la période sèche.

Les traitements administrés au tarissement sont réalisés en pratique, immédiatement après la dernière traite. Si le délai entre la dernière traite et le traitement par voie générale est trop long, la mamelle en cours d'involution sera moins irriguée et sera ainsi moins réceptive aux traitements anti-infectieux. De même, la formation du bouchon de kératine va progressivement gêner l'administration d'un traitement par voie locale ; le retirer constitue un facteur de risque de survenue d'une mammite.

Pour pouvoir être utilisés au moment du tarissement, les antibiotiques doivent soit avoir un excipient retard avec une rémanence d'au moins quatre semaines, soit une longue rémanence au-dessus de la CMI (8 à 10 semaines) (Bergonier, 2014).

Toutefois il semble que l'injection d'antibiotiques pour traiter la mamelle en fin de lactation n'a pas d'impact sur l'incidence des mammites coliformes au vêlage suivant. En effet, Berry et al n'ont pas montré de différence significative de prévalence entre les vaches traitées avec un antibiotique au tarissement par rapport à celles qui ne l'étaient pas. Le taux d'infection par les coliformes avec une mammite clinique au vêlage était de 54,5% dans le groupe traité et de 58,3% dans le groupe non traité (Berry et al, 2002).

*Tableau 13 : Prévalence des différents agents pathogènes par quartier chez les vaches présentant une infection mammaire au vêlage (Berry et al, 2002).*

Pathogen type	IAH herds				Organic herds			
	Treated group	%	Untreated group	%	Treated group	%	Untreated group	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0.2	7	1.4	0	0	12	7.0
<i>Streptococcus uberis</i>	6	1.3	32	6.5	0	0	16	9.3
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0	0	3	0.6	0	0	5	2.9
Coliforms	11	2.4	12	2.4	0	0	2	1.1
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	1	0.2	2	0.4	0	0	1	0.6
Mixed infections	0	0	2	0.4	0	0	2	1.1
Total	19	4.1	58	11.8	0	0	38	22

L'antibiothérapie raisonnée, afin de diminuer les risques d'antibiorésistance, oblige les acteurs de la filière laitière à rechercher d'autres mesures préventives que le traitement systémique au tarissement.



Par exemple, l'application d'un obturateur interne fait partie des mesures préventives. Il permet d'obturer le canal du trayon afin de prévenir les infections. Deux spécialités, qui contiennent du sous-nitrate de bismuth et de la paraffine, forment une pâte visqueuse blanche ce qui constitue une barrière mécanique contre l'entrée de germes dans la glande mammaire. Ce produit doit être éliminé manuellement avant la première tétée.

Berry et Hillerton ont comparé la prévalence de nouvelles infections mammaires et des mammites cliniques entre des vaches ayant reçu un obturateur interne et celles n'ayant reçu aucun traitement. Sur les 197 vaches traitées, aucune n'a présenté de mammite clinique durant la période sèche, contrairement à 6 vaches parmi les 204 qui n'avaient pas été traitées. De plus, les vaches non traitées ont significativement plus de mammites cliniques au vêlage (62 vaches sur 204) que les vaches traitées (21 sur 204).

Une autre étude menée par Godden en 2003 a pour objectif de déterminer les effets de l'association d'un obturateur interne et d'un traitement antibiotique longue action sur l'incidence des nouvelles infections mammaires au cours de la période sèche et au vêlage. L'expérience fut menée sur 437 vaches de deux exploitations laitières. Après la dernière traite, les quatre quartiers étaient traités avec un antibiotique intra-mammaire à longue durée d'action ; seuls deux quartiers étaient traités avec un obturateur interne. Les quartiers ayant reçu l'association des deux traitements ont moins de risque d'être infectés dans les trois jours suivant le vêlage (20,2% avec obturateur contre 25,4% sans obturateur). De plus, les quartiers avec l'obturateur interne sont moins affectés par des mammites cliniques entre le tarissement et le 60<sup>ème</sup> jour post-vêlage (5,9% avec obturateur contre 8,0% sans obturateur).

### 4.3. Vaccination

#### 4.3.1. Moyens, vaccins disponibles

Sachant que les infections mammaires sont à l'origine d'une importante utilisation d'antibiotiques, l'élaboration de vaccins efficaces serait un complément intéressant dans la lutte contre les mammites.

En Amérique du Nord deux vaccins sont commercialisés : J-Vac (Merial, [merial.com](http://merial.com)) et J-5 *Escherichia coli* Bacterin (Zoetis, [zoetis.com](http://zoetis.com)). Actuellement, en Europe, il existe un vaccin commercialisé, STARVAC (Hipra Lab). Ce vaccin est autorisé pour améliorer la lutte contre

les mammites à *E. coli* et à *S. aureus*. Tous ces vaccins contiennent en général une valence constituée par la souche mutante inactivée d'*E. coli* appelée J5, qui possède un LPS de type « rough » et qui correspond à un LPS, incomplet, dépourvu de chaînes lipopolysidiques, ce qui met en avant la partie non variable appelée le « core » du LPS. Ces vaccins permettent alors la production d'anticorps dirigés contre cette partie du LPS.

#### 4.3.2. Résultats attendus

Les vaccins sont destinés à améliorer l'immunité des troupeaux laitiers après un schéma vaccinal comprenant plusieurs injections. Ils sont supposés permettre une réduction de la prévalence des mammites subcliniques, ainsi que l'incidence et la sévérité des signes cliniques. Les vaccins ne peuvent pas empêcher totalement l'infection mais ils réduisent la sévérité des épisodes de mammites colibacillaires. Ils en diminuent aussi la durée de mammites avec des signes cliniques et par conséquent, réduisent la chute de production laitière ou le taux de réforme. Toutefois, les mécanismes à l'origine de cette réduction des signes cliniques ne sont pas connus.

Malgré ces atouts, les vaccins contre *E. coli* séduisent peu les éleveurs pour plusieurs raisons. Tout d'abord, l'efficacité de ces vaccins, bien qu'elle soit démontrée dans les conditions expérimentales, est assez limitée en pratique et lors d'évaluation à grande échelle.

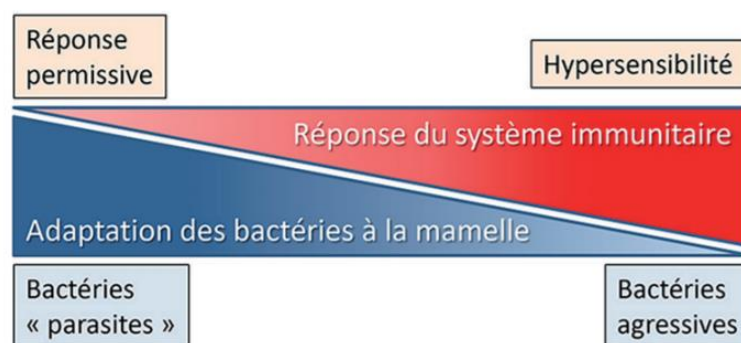


Figure 16 : Interaction des bactéries responsables de mammites avec le système immunitaire de l'hôte (Rainard, 2015).

Le système de défense de la mamelle a aussi son importance dans l'échec du développement de vaccins. En effet, l'immunité humorale est relativement peu efficace au sein de la glande mammaire. Elle n'empêche pas l'infection ou le passage de l'infection à la chronicité, mais elle limite les signes cliniques de la phase aiguë (Hill, 1988). La protection est par ailleurs restreinte à la souche qui a initialement causé la réponse immunitaire ou à des souches étroitement apparentées. Or c'est l'immunité humorale que les vaccins sont capables de provoquer. Le développement d'une réponse cellulaire est techniquement plus compliqué, et reste encore mal maîtrisé en vaccinologie.

Enfin, un autre frein à l'utilisation de ces vaccins est son coût.

Les résultats obtenus par la vaccination contre les mammites à *E. coli* seront d'avantage détaillés lors de la discussion.

## Partie 2 : Etude expérimentale

Cette étude expérimentale s'inscrit dans le cadre du projet européen KOLimastIR (ERA-Net Anihwa). Il couvre la première partie de l'expérimentation sur vache laitière du WP3 de KOLimastIR, à savoir de la période de vaccination jusqu'à l'épreuve infectieuse (infection mammaire induite expérimentalement).

Les vaccins récents reposent sur l'utilisation de bactéries *E. coli* tuées et adjuvées de type J5. Ils ont montré une certaine efficacité dans la réduction de l'incidence des mammites cliniques ainsi que la perte de production laitière.

Les mécanismes d'action du vaccin ne sont pas clairement identifiés. Il est reconnu que les neutrophiles sont essentiels dans le contrôle de l'infection. L'issue favorable d'une mammite colibacillaire dépend du recrutement rapide des neutrophiles viables dans la glande mammaire et le lait.

Cette étude a pour but d'identifier des corrélats immunitaires de la réponse à l'immunisation avec des colibacilles (*Escherichia coli* souche P4) tués, et d'évaluer l'effet de cette vaccination sur le déroulement d'une infection mammaire induite expérimentalement avec la souche vaccinale d'*E. coli* souche P4, ce qui pourrait permettre d'identifier des substituts ou des corrélats de protection.

L'objectif est de déterminer les effets de la voie d'administration pour obtenir les meilleurs résultats (signes cliniques, et réponse inflammatoire et immunitaire) sur la protection de la glande mammaire vis-à-vis de l'infection par *E. coli*.

Un autre objectif de cette étude expérimentale est de comprendre les mécanismes de la réponse inflammatoire et immunitaire des vaches à cette infection, qu'elles aient été vaccinées ou non.

## 1. Matériels et méthodes

### 1.1. Lieu de l'expérience

Cette étude a été menée conjointement avec l'équipe « Immunité et Infections Mammaires » du pôle bactériologie de l'unité Infectiologie et Santé Publique (ISP) de l'INRA de Tours. Les expérimentations animales se sont déroulées au sein de la Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE), située sur le site de Nouzilly. La PFIE dispose d'infrastructures adaptées comme une stabulation avec aire paillée avec des parcs distincts qui ont permis de séparer les vaches en différents lots, une salle de traite, des équipements de contention tels que les cornadis, un couloir et un travail. La présence d'un personnel qualifié a permis de conduire cette étude dans de bonnes conditions pour les animaux et les manipulateurs.



*Figure 17 : Stabulation de la PFIE de l'INRA de Tours*



*Figure 18 : Salle de traite de la PFIE de l'INRA de Tours*

## 1.2. Les animaux

Trente génisses de race Prim'Hostein ont été sélectionnées dans deux exploitations laitières pour cette étude. Toutes sont nées entre septembre et décembre 2012. Elles ont rejoint le site de Nouzilly le 25 février 2014.

*Tableau 14 : Numéros de travail des génisses accueillies à la PFIE*

0271	0272	0273	0274	0275	0276
0279	02781	0282	0283	0284	0286
0287	0288	0289	0291	0292	0293
0294	0295	0296	0297	3725	3727
3729	3732	3733	3734	3735	3742

Dans la suite du protocole, les vaches seront réparties en trois groupes, un groupe « Intramusculaire » (IM), un groupe « Intra-mammaire » (IMM) et un groupe « Contrôle » (C), de tailles à peu près égales, et qui correspondent aux différentes conditions d'immunisation.

L'objectif est d'inclure dans chaque groupe six vaches remplissant les critères d'éligibilité pour l'infection expérimentale. Il y a eu au total deux vagues d'expérimentation. Une troisième a été réalisée pour confirmer certains des résultats obtenus lors des vagues précédentes, mais n'est pas décrite dans ce document.

#### ❖ Synchronisation des chaleurs

Dans un premier temps, toutes les génisses ont subi un traitement hormonal afin de synchroniser leurs chaleurs. L'objectif était alors d'avoir des vêlages regroupés entre le 13 et 27 mars 2015 pour la première vague et entre le 2 et le 10 avril 2015 pour la seconde vague. Le fait d'effectuer une 2<sup>ème</sup> vague un mois après la 1<sup>ère</sup> permet d'inclure les vaches non gravides après la 1<sup>ère</sup> insémination artificielle (IA). Les différentes étapes de ce traitement sont explicitées dans le tableau suivant.

*Tableau 15 : Calendrier des différents traitements pour la synchronisation des chaleurs*

Date pour la 1 <sup>ère</sup> vague	Date pour la 2 <sup>ème</sup> vague	Nature de l'intervention
12/05/2014	02/06/2014	Prise de sang, détermination cyclicité
22/05/2014	12/06/2014	Prise de sang, détermination cyclicité
23/05/2014	13/06/2014	Pose implant et 2,5 ml de Réceptal®
31/05/2014	21/06/2014	5 ml de Dinolytic®
02/06/2014	23/06/2014	Retrait implant
04/06/2014	25/06/2014	Insémination Artificielle
09/07/2014	25/07/2014	Diagnostic de gestation par échographie ou par dosage PSPB

La vache 0271 qui n'a pas été diagnostiquée gravide le 09/07/2014, a subi quatre IA supplémentaires sans succès. Elle a ensuite été retirée de l'étude.

La vache 0272 a été déclarée gravide après la 5<sup>ème</sup> IA réalisée le 30/08/2014. Le vêlage est donc retardé au 08/06/2015. Elle a donc été exclue de la 1<sup>ère</sup> vague.

Les vaches 0273 et 0287 n'ont jamais été cyclées ; elles ont été envoyées à l'abattoir le 10/02/2015.

La vache 0276 a été déclarée gravide après la 5<sup>ème</sup> IA réalisée le 21/10/2014 avec un vêlage prévu pour le 30/07/2015. Cependant, après une palpation transrectale, elle n'est pas gravide le 06/02/2015 et est envoyée à l'abattoir le 11/02/2015.

La vache 0282 est gravide à la deuxième IA réalisée le 24/06/2014, mais le vêlage a eu lieu le 08/03/2015. Elle reste donc dans la 1<sup>ère</sup> vague.

Les vaches 0286 et 3725 gravides après de la deuxième IA réalisée respectivement le 02/07/2014 et le 25/06/2016 ont été transférées dans la 2<sup>ème</sup> vague.

Les vache 0288 et 0291 ont été diagnostiquées gravides après la 2<sup>ème</sup> IA effectuée le 11/09/2014, les vêlages sont alors prévus autour du 20/06/2015. Ces vaches sont donc exclues de la 1<sup>ère</sup> vague.

De même, les vaches 0294, 0295 et 3733 ont dû être exclues de la 2<sup>ème</sup> vague car elles ont été fécondées lors de la 3<sup>ème</sup> IA réalisée respectivement le 11/06/2014, le 29/09/2016 et le 07/08/2014 avec des vêlages prévus entre le 15/05/2015 et 20/06/2015.

La vache 3742 a été diagnostiquée gravide après six IA, le vêlage était prévu autour du 24/07/2015.

#### ❖ Critères d'éligibilité pour l'infection mammaire

Tout d'abord, les vaches doivent être en lactation avec une mamelle saine au moment de l'inoculation. Elles ne doivent pas avoir d'antécédent médical sévère, en particulier de la mamelle. Le statut sanitaire de la mamelle doit être le meilleur possible, à savoir que la vache ne présente pas de quartier stérile, pas d'infection par un agent pathogène majeur dans aucun des quatre quartiers. La concentration cellulaire dans le lait des différents quartiers doit être faible, avec une CCS inférieure à 100 000 cellules/ml.

Ainsi la vache 0296 ayant présenté des troubles locomoteurs à la suite d'une lésion nerveuse a dû être euthanasiée le 11/02/2015.



❖ Répartition des vaches

Tableau 16 : Répartition des vaches dans les différentes vagues

Vague 1			Vague 2			Vague 3		
0274	0275	0279	0286	0289	0292			
0281	0282	0283	0293	0297	3729	0272	0295	3733
0284	3725	3727	3732	3734	3735			

Dans chaque vague, les vaches ont été réparties dans trois groupes. Cette répartition a été réalisée de façon aléatoire. Les différents agents et manipulateurs ignorent la répartition des vaches afin qu'ils restent les plus objectifs possible au moment des évaluations cliniques.

Tableau 17 : Composition définitive des différentes vagues et lots expérimentaux

	Vague 1			Vague 2		
Témoins	0274	0275	0282	0293	0297	3729
Intramusculaire	0279	0281	3727	0286	0289	3732
Intra-mammaire	0283	0284	3725	0292	3734	3735

Toutes les vaches ont reçu le 24/11/2014 un traitement antiparasitaire IVOMEC-D® soit trois semaines avant la primo-immunisation de la 1<sup>ère</sup> vague.

Enfin, elles ont toutes été logées et alimentées dans des conditions identiques.

Le mois précédent la date du vêlage théorique, une transition alimentaire progressive, sur une semaine environ, a été réalisée, de la ration à base de foin et de concentrés à une ration à base d'ensilage de maïs, et de concentrés, un mélange de soja, de froment, d'orge et de maïs. Cette ration a été élaborée pour couvrir les besoins des vaches en fin de gestation et au début de la lactation.

Après le vêlage, l'absence de troubles du post-partum comme une rétention placentaire, une métrite ou une cétose subclinique ( $\beta\text{-OH} > 1,4 \text{ mm/L}$ ) est due aux mesures préventives qui ont été appliquées ainsi qu'à des examens cliniques réguliers et de nombreux dosages comme le

$\beta$ -OH sanguins (Optium Xceed, Abott) pour connaître leur statut et le corriger éventuellement.

### 1.3. L'immunisation

La souche d'*E. coli* utilisée est la souche P4. Cette souche a été isolée lors d'une mammite clinique sévère chez une vache. Le vaccin contient des bactéries tuées par la chaleur. Elles ont été obtenues par culture durant une nuit à 37°C sous une agitation modérée (150 tours/min). Les bactéries ont été récoltées par centrifugation (3500 x g à 20°C pendant 15 minutes) puis mises en suspension dans du PBS. Les bactéries ont été tuées à 60°C pendant 60 minutes. Une dose de vaccin contient environ  $2 \times 10^9$  bactéries tuées.

Les vaches ont été réparties dans trois groupes :

- Le groupe Intramusculaire : les vaches sont immunisées à deux reprises par voie intramusculaire, avec un intervalle de deux mois entre les injections.
- Le groupe Intra-mammaire : les vaches reçoivent la même première injection par voie intramusculaire que les vaches du groupe intramusculaire puis la seconde injection a été réalisée par voie intra-mammaire.
- Le groupe témoin : les vaches ne sont pas immunisées, et ont reçu deux injections d'adjuvant seul.

Les vaches du groupe « Intramusculaire » et « Intra-mammaire » ont subi deux injections, séparées de 60 jours, la dernière survenant environ 1 mois avant le vêlage. Cette immunisation est réalisée avec une préparation contenant la bactérie *E.coli*, souche P4 tuées, avec un adjuvant de type Montanide.

La voie intra-mammaire a été choisie pour évaluer l'effet d'une immunisation locale sur la réponse immunitaire mammaire.

Concernant les procédures d'immunisation :

- Pour les immunisations intramusculaires : les animaux ont été attachés au cornadis, une injection de 2 ml de la préparation vaccinale a été réalisée à l'encolure. La préparation vaccinale contient une suspension (0,8 ml) de bactéries tuées par la

chaleur émulsionnée dans 1,2 ml d'adjuvant huileux (Montanide® ISA 61VG, Seppic).

→ Pour les immunisations intra-mammaires : les animaux sont contenus dans un travail avec une trappe d'accès à la mamelle. Après un nettoyage et une désinfection (alcool à 70%) de l'extrémité des trayons, un peu de sécrétion mammaire est prélevé pour analyse bactériologique. Après une nouvelle désinfection apicale, les quatre quartiers ont reçu la préparation antigénique (surnageant de culture bactérienne, concentrée et filtrée) sans adjuvant, par voie diathélique (infusion par le canal du trayon). Dans deux quartiers (côté gauche), un traitement avec Orbenin HL® (Zoetis) est administré après l'infusion antigénique. Ensuite, les quatre quartiers ont reçu un obturateur interne de trayon, Orbeseal® (Zoetis).



*Figure 19 : Contention de la vache lors de l'immunisation intra-mammaire*

Tableau 18 : Calendrier de l'immunisation des vaches

	Primo-immunisation	Rappel
1 <sup>ère</sup> vague	16 décembre 2014	17 février 2015
2 <sup>ème</sup> vague	6 janvier 2015	10 mars 2015

#### 1.4. Epreuve bactérienne

Toutes les vaches de chaque vague ont subi une inoculation bactérienne par voie intramammaire. Cette épreuve infectieuse se déroule un peu plus d'un mois après le vêlage, soit de 44 à 56 jours de lactation (en moyenne 49 jours). Ainsi, les animaux sont inoculés alors qu'ils sont dans la salle de traite. Après un nettoyage et une désinfection, alcool à 70%, une préparation contenant 1000 UFC de la souche *E. coli* P4 en suspension dans du PBS, sous un volume de 1 ml, est injectée dans un seul des quartiers. Cette préparation est obtenue après culture bactérienne de la souche *E. coli* P4 durant une nuit à 37°C, puis les bactéries ont été collectées par centrifugation avant d'être diluées dans du PBS à la concentration souhaitée par une mesure de la densité optique à 600 nm. Le choix du quartier éprouvé a été fait en privilégiant un des deux quartiers arrières, dans la mesure où ces derniers étaient sains. Au préalable, le lait de chaque quartier a été analysé à l'aide d'une analyse bactériologique et d'une mesure de la CCS sur les sécrétions mammaires afin de s'assurer de l'absence d'infection. L'analyse bactériologique doit être négative et la CCS doit être inférieure à 50 000 cellules/ml pour que le quartier puisse être inoculé.



*Figure 20 : Capture d'écran lors de la vidéo de l'inoculation bactérienne d'une vache*

*Tableau 19 : Date de vêlage et du challenge bactérien des vaches*

	Date de vêlage	Epreuve bactérienne
1 <sup>ère</sup> vague	13-27 mars	21 avril 2015 à 00h
2 <sup>ème</sup> vague	2-10 avril	19 mai 2015 à 00h

### 1.5. Score et examen clinique

Les examens cliniques, état clinique général et mamelle, ont été réalisés après le vêlage, puis avant et après l'inoculation. Le jour précédant l'inoculation, chaque vache a été examinée deux fois permettant ainsi de connaître l'état basal de chacune d'entre elles. Ensuite les examens cliniques ont eu lieu toutes les 4 heures après l'inoculation pendant 24h, puis toutes les 8 heures le deuxième jour suivant l'inoculation, ensuite deux fois par jour le troisième jour suivant l'inoculation et enfin une fois par jour à partir du quatrième jour post-inoculation.

## ❖ Etat général

L'examen clinique exhaustif a été réalisé en stabulation. Chaque vache est contenue au cornadis, permettant un meilleur confort pour l'examen, et notamment l'auscultation. Les différents paramètres enregistrés ont été les suivants.

- Fréquence cardiaque, en battements par minute
- Fréquence respiratoire, en mouvements par minute
- Température rectale, en °C
- Fréquence des contractions ruminales pour une durée de 5 minutes
- Couleur des muqueuses
- Etat de déshydratation
- Vigilance
- Appétit
- Décubitus éventuel

Certains paramètres sont quantitatifs comme la fréquence cardiaque ou respiratoire, la température, la fréquence des contractions ruminales. Ainsi leur valeur ne diffère pas d'un opérateur à l'autre. De plus, chaque vache était équipée d'un capteur intra-ruminal mesurant la température en continu.

Néanmoins, les autres paramètres font appel à une interprétation personnelle de la part de l'opérateur. En outre, pour être évalués, ces derniers requièrent parfois une durée d'observation des vaches relativement longue par les opérateurs. Par exemple, le paramètre pour évaluer l'appétit était seulement évalué au moment de la distribution de la ration aux vaches. Ainsi pour ces paramètres, il existe une plus grande variabilité des valeurs. Afin de diminuer ce biais, les différents paramètres étaient clairement explicités (comme le montre la fiche d'enregistrement en Annexe 1). De plus, deux opérateurs évaluaient ces paramètres pour contrôler le risque de dérive.

En fonction des résultats obtenus pour chaque paramètre, il était possible de donner un score clinique pour chaque vache, reflet de son état à un moment donné. Le score a été élaboré à partir des travaux de Wenz en 2006. Une feuille par vache était complétée à chaque date d'examen.

## ❖ Mamelle et lait

L'examen de la mamelle et du lait a eu lieu dans la salle de traite et précédait chaque traite. Comme pour l'examen clinique, chaque mamelle était examinée par deux opérateurs différents pour assurer une meilleure reproductibilité de l'enregistrement des données.

Lors de l'examen de la mamelle, les signes de l'inflammation ont été recherchés à savoir, la rougeur, la chaleur, le gonflement, l'induration et la douleur à la palpation.

L'examen du lait consiste quant à lui à repérer toute modification de la couleur et de l'aspect macroscopique du lait. En cas de doute, un CMT a été pratiqué. Ces examens ont été réalisés pour les quatre quartiers de la mamelle et ont permis d'attribuer un score à chaque quartier.

### 1.6. Prélèvement d'échantillons

Les prélèvements d'échantillons ont été réalisés avant et à différentes dates après l'inoculation. Les figures suivantes montrent les dates et la nature de chaque prélèvement.

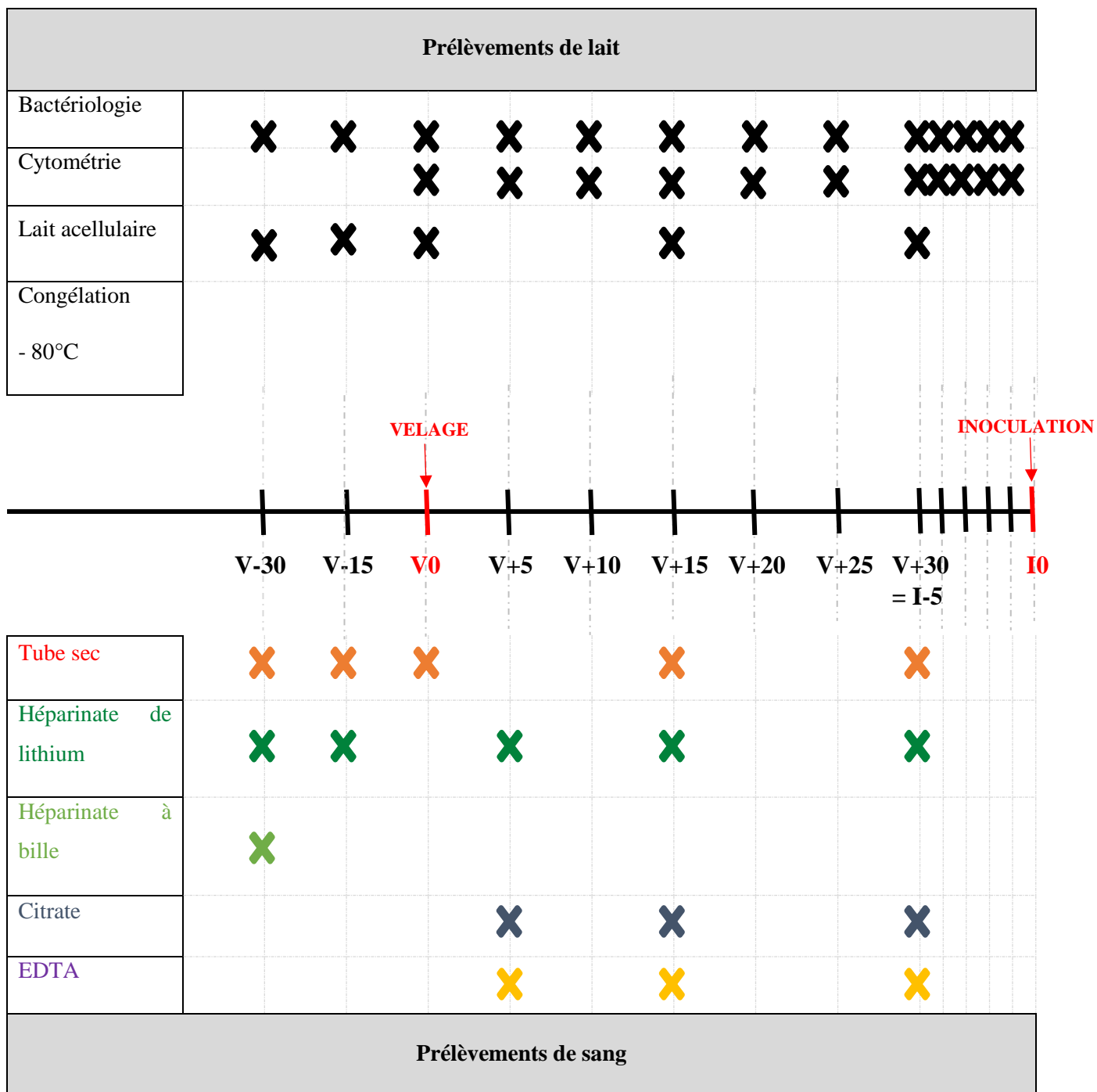


Figure 21 : Prélèvements réalisés avant l'inoculation bactérienne



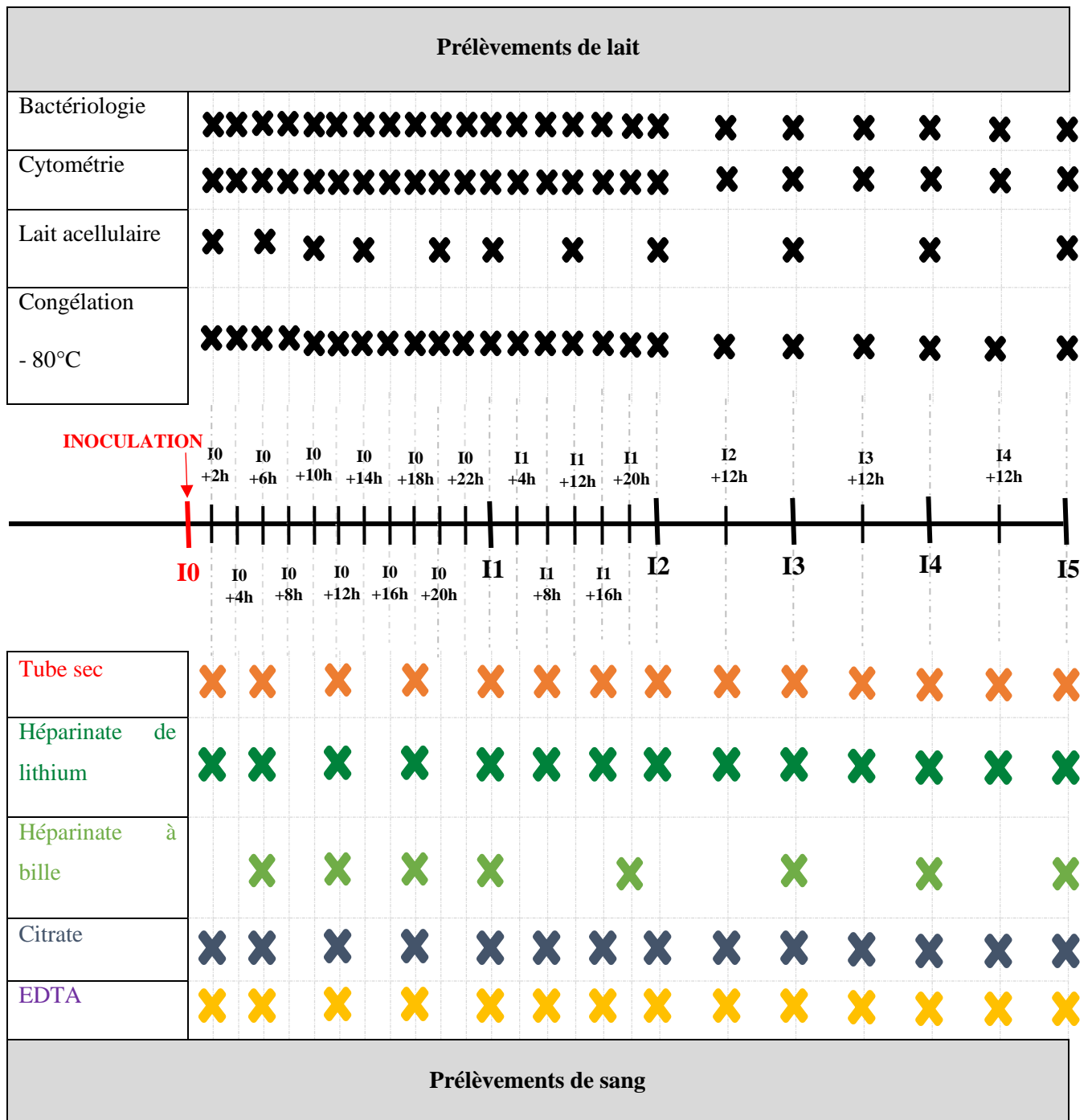


Figure 22 : Prélèvements réalisés après l'inoculation bactérienne

## ❖ Lait

Les vaches ont été traitées deux fois par jour, à 8h et à 16h. Un pré-trempeage et un post-trempeage ont été réalisés de façon systématique. Tous les prélèvements de lait ont été réalisés en salle de traite. Dans tous les cas, mais en particulier pour les analyses bactériologiques, des précautions d'asepsie sont requises au moment du prélèvement. Seul le lait du quartier inoculé est prélevé. Après nettoyage et désinfection (avec un tampon de coton imprégné d'alcool à 70%) de l'extrémité du trayon, les premiers jets de lait sont écartés, puis le lait est collecté dans des flacons stériles.

Ces échantillons serviront à mesurer d'une part, le statut sanitaire de la mamelle, mais surtout à évaluer la différence de réponse en relation avec la vaccination.

Pour les analyses bactériologiques, les numérations cellulaires, les dosages d'anticorps, et l'activité opsonisante et bactériostatique, des échantillons de 15 à 20 ml suffisent.

Pour la caractérisation des cellules du lait, des échantillons d'au moins 50 ml sont nécessaires.

Tableau 20 : Différents types d'analyse du lait

Analyse	Délai d'analyse	Modalité de conditionnement
Bactériologie	< 2h	Froid positif ou température ambiante
Cytométrie	< 24h	Froid positif
Lait acellulaire		Centrifugation, élimination anneaux gras gras et aliquotage de la phase liquide Congélation -20°C
Lait total	< 1h	Congélation -80°C

## ❖ Sang

Les prélèvements sont réalisés de préférence par ponction de la veine jugulaire. Toutefois, pour un type donné d'analyse, le site de prélèvement sera toujours le même (jugulaire ou caudal). Ainsi, la mesure des  $\beta$ -OH a été effectuée à partir de sang prélevé à la veine coccygienne.

Différents types de tubes seront utilisés en fonction de la nature de l'analyse à réaliser. Ils sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 21 : Différents types d'analyse du sang

Tube de prélèvement	Analyse réalisée	Délai de conditionnement	Modalités de conditionnement
Tube sec	Dosage sérologique	< 1h	Centrifugation (5min, 3000 tours/min) Aliquotage du sérum Stockage congélateur -20°C
Tube héparinate de lithium	Biochimie sanguine AGNE, SAA, haptoglobuline, PT, Alb, Chol, ASAT, CK, GGT, VitA, urée, Ca, Mg	<1h	Centrifugation (5 min, 3000 tours/min) Alicotage du plasma Stockage congélateur -20°C
Tube héparinate à bille	Biochimie sanguine	< 1h	Centrifugation, 5 min, 3000 tours/min) Alicotage du plasma Stockage congélateur -20°C
	Zinc		
	GSH-pxe	< 1h	Centrifugation (5 min, 3000 tours/min) Culot hématies Conservation au froid positif Envoi NBVC < 24h
Tube citraté	Temps de coagulation (TT, PT, APTT, FDPs) Fibrinogène	< 2h	Centrifugation (5 min, 3000 tours/min) Alicotage du plasma Stockage congélateur -80°C
Tube EDTA	Hémogramme	< 1h	Analyse directe sur tube
	B-OH	< 1h	Analyse directe avec OptiumXceed®

### 1.7. Production de lait, comptage des cellules somatiques

La production laitière a été mesurée par pesée à chaque traite. Toutefois, il s'agit de la production du lait des quatre quartiers. La production de chaque quartier n'a pas pu être isolée. La production laitière journalière après l'épreuve infectieuse est exprimée en pourcentage de la moyenne de la production laitière durant les 12 jours précédant l'inoculation.

La CCS a été mesurée par l'analyseur Fossomatic model 90 (Foss Food Technology, Hillerod, Danemark) sur tous les échantillons de lait collectés durant la période suivant l'inoculation.

### 1.8. Comptage bactérien et durée de l'infection mammaire

La concentration de bactéries dans le lait est exprimée en unités formant colonie (UFC) par millilitre de lait. Elle a été mesurée sur tous les échantillons de lait collectés durant la période suivant l'inoculation.

Les échantillons de lait ont été collectés dans une solution d'Alsever puis centrifugés pendant 15 min à 800 x g à 4°C. Le culot cellulaire a été rincé deux fois avec du PBS avant l'incubation pendant 30 minutes dans l'obscurité et à température ambiante.

### 1.9. Analyse statistique

Toutes les données sont exprimées comme la moyenne des valeurs  $\pm$  écart-type des vaches de chaque groupe (n=6). Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism 6.0 en utilisant un modèle d'analyse de variance à deux paramètres (Two-way ANOVA) avec la correction de Bonferroni. Les résultats ont aussi été soumis au test de Mann-Whitney. Un résultat est considéré comme significatif lorsque la p-value est inférieure à 0,05.

## 2. Résultats

### 2.1. Signes cliniques systémiques et température ruminale

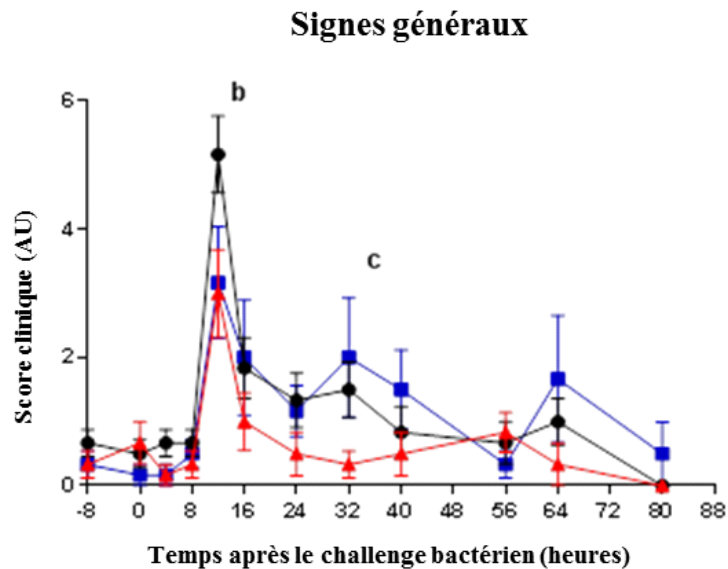


Figure 23 : Moyennes des scores cliniques des signes généraux suite à une épreuve intramammaire avec *E. coli* P4 à 0h chez des vaches primipares ayant reçu l'adjuvant seul ( — ), immunisées par voie intramusculaire (—) et immunisées par voie intra-mammaire ( — ). Les barres de dispersion représentent les erreurs-types pour chaque groupe. Les différentes lettres (a, b, c) indiquent les résultats significatifs ( $p < 0,05$ ) respectivement entre les groupes Contrôle et Intramusculaire, les groupes Contrôle et Intra-mammaire et les groupes Intra-mammaire et Intramusculaire.

Avant l'inoculation, toutes les vaches ont eu un score clinique inférieur à 1, quel que soit le groupe. Après l'inoculation, toutes les vaches ont développé une mammite clinique avec des signes généraux d'intensité modérée à sévère. A 12h post-inoculation, les scores cliniques ont atteint un pic. Ils sont respectivement pour les vaches des groupes IMM, IM et C de 2,8, 3 et 5,1. Ainsi les signes systémiques ont été significativement moins marqués pour le groupe IMM que le groupe C ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney Test), et tendent à être plus faibles que ceux du groupe IM, mais ce résultat n'est pas significatif ( $p = 0,12$ ).

A 32 heures post-inoculation, une deuxième phase caractérisée par une augmentation du score clinique systémique avec des signes cliniques systémiques significativement plus sévères est présent chez les vache du groupe IM par comparaison aux deux autres groupes (2 pour IM vs 0,33 pour IMM ;  $p < 0,05$ , Two-way ANOVA, and Mann-Whitney Test). Ce sursaut est moindre pour le groupe C et pratiquement absent chez le groupe IMM.

A 40 h post-inoculation, le score de toutes les vaches est revenu à la valeur précédant l'inoculation ; certaines présentaient des signes légers.

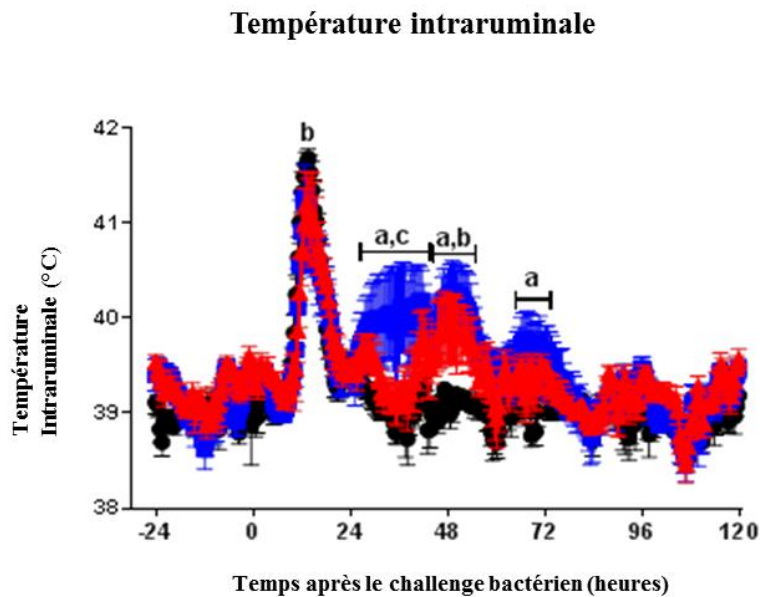


Figure 24 : Moyennes de la température intraruminale suite à une épreuve intra-mammaire avec *E. coli* P4 à 0h chez des vaches primipares ayant reçu l'adjuvant seul (—), immunisées par voie intramusculaire (—) et immunisées par voie intra-mammaire (—). Les barres de dispersion représentent les erreurs-types pour chaque groupe. Les différentes lettres (a, b, c) indiquent les résultats significatifs ( $p < 0,05$ ) respectivement entre les groupes Contrôle et Intramusculaire, les groupes Contrôle et Intra-mammaire et les groupes Intra-mammaire et Intramusculaire.

A 14 heures post-inoculation, toutes les vaches ont eu un pic d'hyperthermie atteignant 41,5°C. Toutefois, la température intra-ruminale chez le groupe IMM est moins élevée que celle des deux autres groupes. Cette différence est significative entre le groupe IMM et le groupe C mais elle ne l'est pas entre le groupe IMM et le groupe IM. Le groupe IM a présenté encore un deuxième et troisième pic d'hyperthermie avec une température supérieure à 40°C. Cette valeur est significativement plus élevée que celle du groupe C à 30-50 heures post-inoculation et 68-76 heures post-inoculation. De même, cette valeur de température est plus élevée que celle du groupe IMM à 30-40 heures post-inoculation.

La température intra-ruminale du groupe IMM est significativement plus élevée que celle du groupe C sur une brève période à 46-52 heures post-inoculation (Two-way ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### Scores cliniques généraux cumulés sur 80 heures

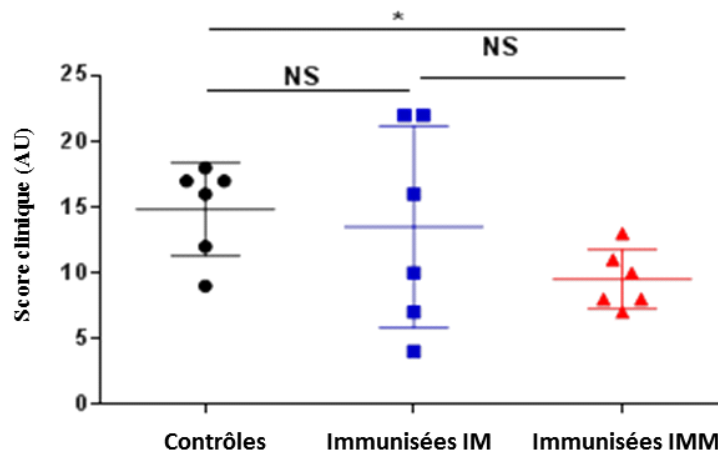


Figure 25 : Moyennes des scores cliniques généraux cumulés sur les 80 premières heures suite à une épreuve intra-mammaire avec *E. coli* P4 chez des vaches primipares ayant reçu l'adjuvant seul ( — ), immunisées par voie intramusculaire ( — ) et immunisées par voie intra-mammaire ( — ). Les barres de dispersion représentent les écart-types pour chaque groupe. Les astérisques indiquent une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les différents groupes.

La comparaison des scores cliniques systémiques cumulés sur une période d'observation de 80 heures montre que la sévérité des signes cliniques systémiques est significativement moindre chez le groupe IMM que chez le groupe C ( $p = 0,02$  ; Two-way ANOVA, and Mann-Whitney Test).

Le groupe IM a présenté une grande variabilité des scores cliniques systémiques cumulés sur cette période d'observation.

## 2.2. Signes locaux et production laitière

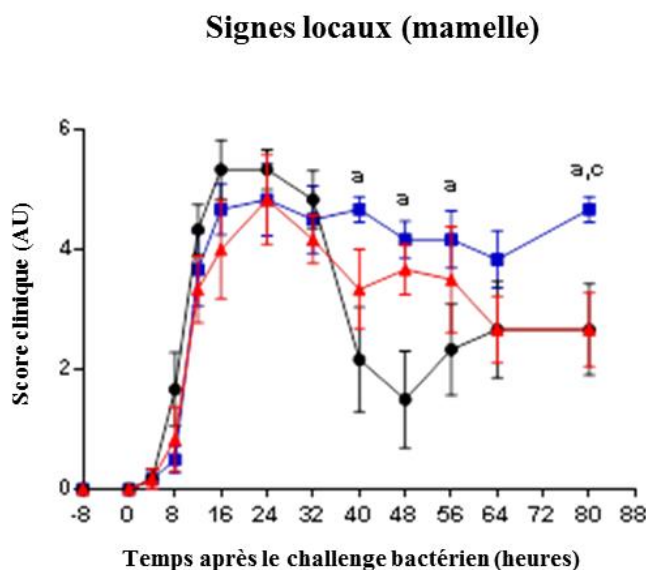


Figure 26 : Moyennes des scores cliniques des signes locaux suite à une épreuve intramammaire avec *E. coli* P4 à 0h chez des vaches primipares ayant reçu l'adjuvant seul (—), immunisées par voie intramusculaire (—) et immunisées par voie intra-mammaire (—). Les barres de dispersion représentent les erreurs-types pour chaque groupe. Les différentes lettres (a, b, c) indiquent les résultats significatifs ( $p < 0,05$ ) respectivement entre les groupes Contrôle et Intramusculaire, les groupes Contrôle et Intra-mammaire et les groupes Intra-mammaire et Intramusculaire.

Toutes les vaches, quel que soit leur groupe, ont eu des signes locaux de mammite tels que la rougeur, la congestion ou le gonflement de la mamelle plus ou moins associés à une modification de la composition du lait. Pour la plupart, ces signes ont été détectés environ 12h après l'inoculation. Durant la phase aiguë de la mammite soit entre 0 et 32h post-inoculation, les signes locaux n'ont pas significativement différé d'un groupe à l'autre ; le groupe C ayant tout de même un score clinique plus élevé que les groupes IMM et IM.

Cependant, les scores cliniques mammaires ont diminué entre 40 et 80 heures post-inoculation pour les groupes C et IMM. Cette baisse est plus marquée dans le groupe C. Les scores cliniques de ces deux groupes sont pratiquement similaires à 64 et 80 heures post-inoculation avec des signes locaux modérés. Par contre, le score clinique mammaire reste élevé pour les vaches du groupe IM. Dans ce groupe, il a été noté une persistance de l'inflammation locale de 40h après l'inoculation jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ainsi le score clinique mammaire pour le groupe IM est significativement plus élevé que celui du groupe C et que



celui du groupe IMM, respectivement à 40, 48, 56 et 80 heures post-inoculation et à 80 heures post-inoculation ( $p < 0,05$  ; Two-way ANOVA, and Mann-Whitney Test).

### Scores cliniques locaux cumulés sur 80 heures

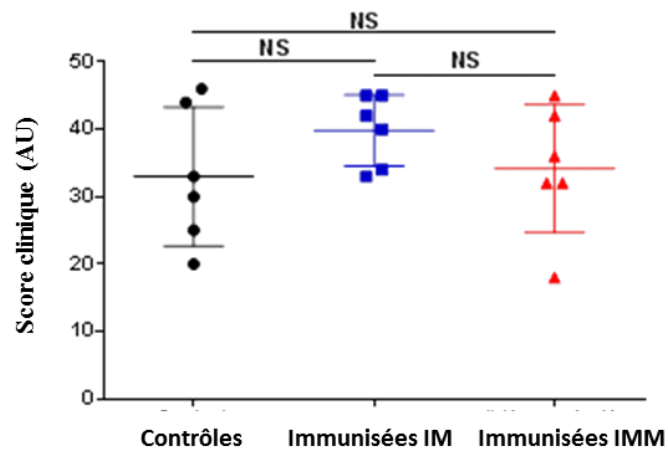


Figure 27 : Moyennes des scores cliniques locaux cumulés sur les 80 premières heures suite à une épreuve intra-mammaire avec *E. coli* P4 chez des vaches primipares ayant reçu l'adjuvant seul ( — ), immunisées par voie intramusculaire ( — ) et immunisées par voie intra-mammaire ( — ). Les barres de dispersion représentent les écart-types pour chaque groupe. Les astérisques indiquent une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les différents groupes.

Concernant les scores cliniques locaux (ou mammaires) cumulés sur les 80 heures d'expérimentation, il n'existe pas de différence significative de la sévérité des signes mammaires entre les trois groupes.

### Production laitière

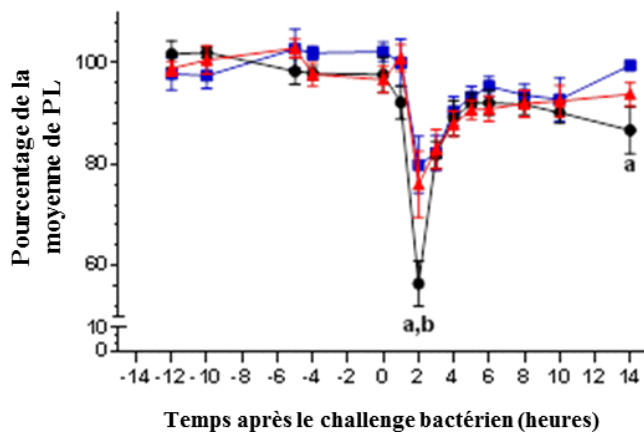


Figure 28 : Moyennes de la production laitière journalière, pourcentage de la production laitière de référence suite à une épreuve intra-mammaire avec *E. coli* P4 à 0h chez des vaches primipares ayant reçu l'adjuvant seul (—), immunisées par voie intramusculaire (—) et immunisées par voie intra-mammaire (—). Les barres de dispersion représentent les erreurs-types pour chaque groupe. Les différentes lettres (a, b, c) indiquent les résultats significatifs ( $p < 0,05$ ) respectivement entre les groupes Contrôle et Intramusculaire, les groupes Contrôle et Intra-mammaire et les groupes Intra-mammaire et Intramusculaire.

Enfin, la production laitière globale, qui est exprimée en pourcentage de la production moyenne des jours précédant l'épreuve, a brutalement chuté chez toutes les vaches dans les deux jours suivant l'inoculation. Toutefois au 2<sup>ème</sup> jour après l'inoculation, le groupe C a connu une chute significativement plus marquée de la production laitière en comparaison des groupes IMM et IM. Durant ce jour, les productions laitières pour le groupe IM, IMM et C étaient respectivement de 79,9%, 76% and 56,5% de la production moyenne des jours précédant l'inoculation bactérienne.

Au 14<sup>ème</sup> jour après l'inoculation, le groupe C a de nouveau montré une production laitière significativement inférieure à celle du groupe IM.

### Production laitière du jour 1 au jour 6

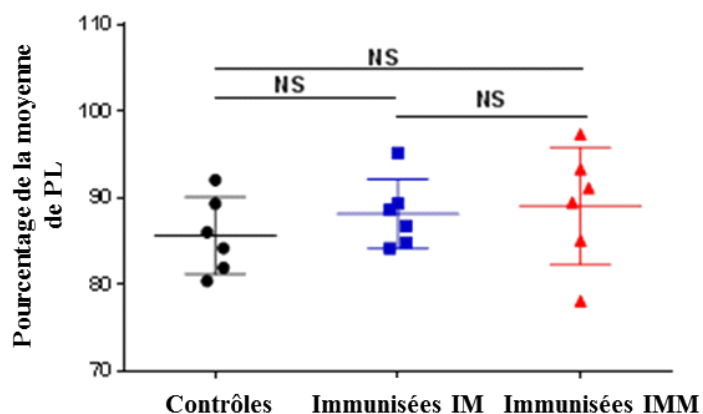


Figure 29 : Production laitière du jour 1 au jour 6 suite à une épreuve intra-mammaire avec *E. coli* P4 chez des vaches primipares ayant reçu l'adjuvant seul ( — ), immunisées par voie intramusculaire ( — ) et immunisées par voie intra-mammaire ( — ). Les barres de dispersion représentent les écart-types pour chaque groupe. Les astérisques indiquent une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les différents groupes.

Il n'existe pas de différence significative de la production laitière moyenne sur les 6 jours de l'expérience entre les différents groupes.

### 2.3. Concentration bactérienne et durée de l'infection

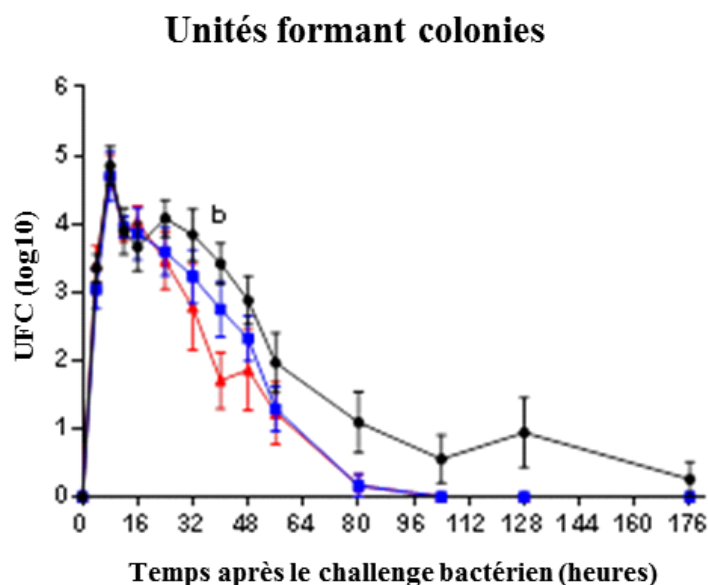


Figure 30 : Moyennes des unités formant colonies (UFC) suite à une épreuve intra-mammaire avec *E. coli* P4 à 0h chez des vaches primipares ayant reçu l'adjuvant seul (—), immunisées par voie intramusculaire (—) et immunisées par voie intra-mammaire (—). Les barres de dispersion représentent les erreurs-types pour chaque groupe. Les différentes lettres (a, b, c) indiquent les résultats significatifs ( $p < 0,05$ ) respectivement entre les groupes Contrôle et Intramusculaire, les groupes Contrôle et Intra-mammaire et les groupes Intra-mammaire et Intramusculaire.

Les moyennes des concentrations des bactéries pour chaque groupe expérimental ont atteint un maximum vers 8 heures après l'inoculation. A partir de cette date, les concentrations de bactéries dans le lait des quartiers inoculés ont progressivement diminué dans les trois groupes. Toutefois, elles sont significativement plus faibles dans le groupe IMM comparativement au groupe C, 40 h post-inoculation (140 log vs 1380 log ;  $p < 0.05$ , Mann-Whitney Test).

De plus, l'élimination des bactéries du lait est totale pour le groupe IMM et IM au-delà de 104 heures après l'inoculation. Le lait des vaches du groupe C contient encore des bactéries *E. coli* à la fin des enregistrements.

### Durée de l'infection intramammaire

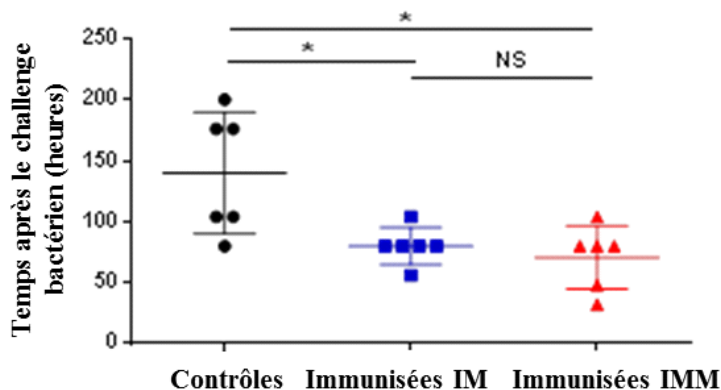


Figure 31 : Durée moyenne de l'infection mammaire suite à une épreuve intra-mammaire avec *E. coli* P4 chez des vaches primipares ayant reçu l'adjuvant seul ( — ), immunisées par voie intramusculaire ( — ) et immunisées par voie intra-mammaire ( — ). Les barres de dispersion représentent les écart-types pour chaque groupe. Les astérisques indiquent une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les différents groupes.

En outre, la durée moyenne de l'infection mammaire est significativement plus faible pour les groupes immunisés ( $80 \pm 6,2$  heures et  $71 \pm 10,6$  heures respectivement pour les groupes IM et IMM) que pour le groupe témoin ( $140 \pm 20,3$  heures ;  $p < 0,05$ , Man-Whitney test). Toutefois, il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes immunisés.

## 2.4. Concentration des cellules somatiques, CCS et caractérisation des types cellulaires dans le lait

### Comptage des cellules somatiques du lait

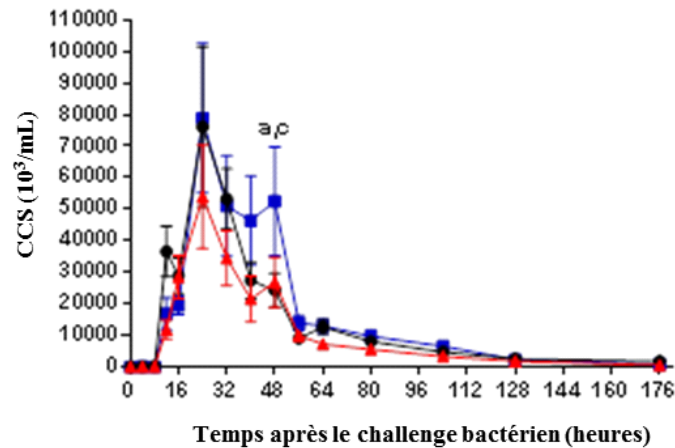


Figure 32 : Moyennes des comptages des cellules somatiques du lait suite à une épreuve intra-mammaire avec *E. coli* P4 à 0h chez des vaches primipares ayant reçu l'adjuvant seul ( — ), immunisées par voie intramusculaire ( — ) et immunisées par voie intra-mammaire ( — ). Les barres de dispersion représentent les erreurs-types pour chaque groupe. Les différentes lettres (a, b, c) indiquent les résultats significatifs ( $p < 0,05$ ) respectivement entre les groupes Contrôle et Intramusculaire, les groupes Contrôle et Intra-mammaire et les groupes Intra-mammaire et Intramusculaire.

Toutes les vaches ont vu la concentration des cellules du lait augmenter de façon marquée 12h après l'inoculation pour atteindre un pic à 24 h post-inoculation.

Bien que cette différence ne soit pas significative, le groupe IMM a présenté un plus faible taux de CCS que les vaches des groupes C et IM.

Le groupe IM a présenté à 48 h, un second pic avec une valeur CCS moyenne de 50 millions de cellules/ml. Cette valeur de CCS est significativement plus grande dans ce groupe que dans les groupes C et IMM.

## Lymphocytes dans le lait

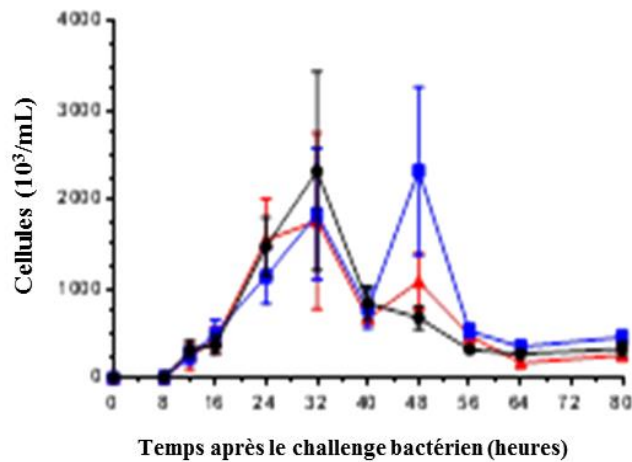


Figure 33 : Moyennes de la concentration des lymphocytes dans le lait suite à une épreuve intra-mammaire avec *E. coli* P4 à 0h chez des vaches primipares ayant reçu l'adjuvant seul ( — ), immunisées par voie intramusculaire ( — ) et immunisées par voie intra-mammaire ( — ). Les barres de dispersion représentent les erreurs-types pour chaque groupe. Les différentes lettres (a, b, c) indiquent les résultats significatifs ( $p < 0,05$ ) respectivement entre les groupes Contrôle et Intramusculaire, les groupes Contrôle et Intra-mammaire et les groupes Intra-mammaire et Intramusculaire.

Dans les différents groupes, nous avons aussi observé une augmentation du nombre de lymphocytes dans le lait à partir de 8h post-inoculation avec un pic à 32h post-inoculation. Le groupe IM a présenté un deuxième pic à 48h post-inoculation. Cependant cette augmentation n'est pas significative par rapport aux deux autres groupes.

### PMN vivants dans le lait

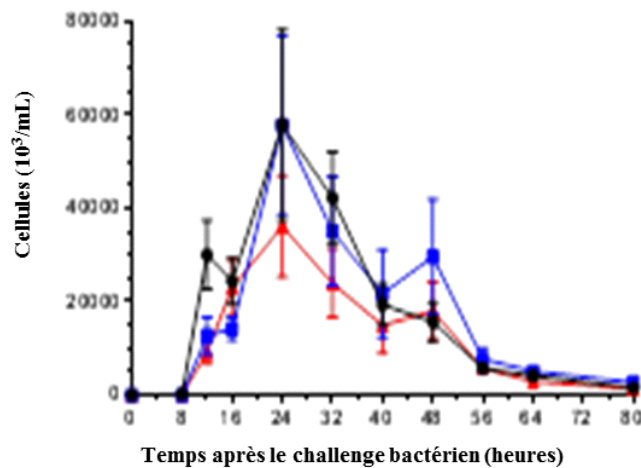


Figure 34 : Moyennes de la concentration des PMN vivants dans le lait suite à une épreuve intra-mammaire avec *E. coli* P4 à 0h chez des vaches primipares ayant reçu l'adjuvant seul ( — ), immunisées par voie intramusculaire ( — ) et immunisées par voie intra-mammaire ( — ). Les barres de dispersion représentent les erreurs-types pour chaque groupe. Les différentes lettres (a, b, c) indiquent les résultats significatifs ( $p < 0,05$ ) respectivement entre les groupes Contrôle et Intramusculaire, les groupes Contrôle et Intra-mammaire et les groupes Intra-mammaire et Intramusculaire.

Le nombre de PMN a augmenté dans le lait à partir de 8h post-inoculation et a atteint un pic à 24h post-inoculation chez toutes les vaches. Alors que les groupes IMM et C ont vu leur nombre de PMN diminuer progressivement à partir de cette date, le groupe IM a présenté une nouvelle augmentation du nombre de PMN dans le lait à 48 h post-inoculation, sans pour autant que cette hausse soit significative.

Ainsi le second pic de CCS observé dans le groupe IM à 48 h post-inoculation est dû à une augmentation de la quantité de neutrophiles et de lymphocytes dans le lait.



## 2.5. Leucocytes sanguins

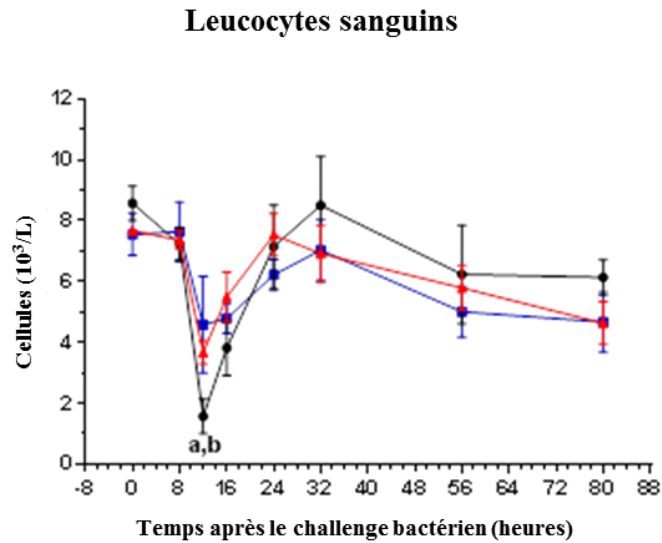


Figure 35 : Moyennes de la concentration des leucocytes sanguins suite à une épreuve intramammaire avec *E. coli* P4 à 0h chez des vaches primipares ayant reçu l'adjuvant seul ( — ), immunisées par voie intramusculaire ( — ) et immunisées par voie intra-mammaire ( — ). Les barres de dispersion représentent les erreurs-types pour chaque groupe. Les différentes lettres (a, b, c) indiquent les résultats significatifs ( $p < 0,05$ ) respectivement entre les groupes Contrôle et Intramusculaire, les groupes Contrôle et Intra-mammaire et les groupes Intra-mammaire et Intramusculaire.

### Lymphocytes T sanguins

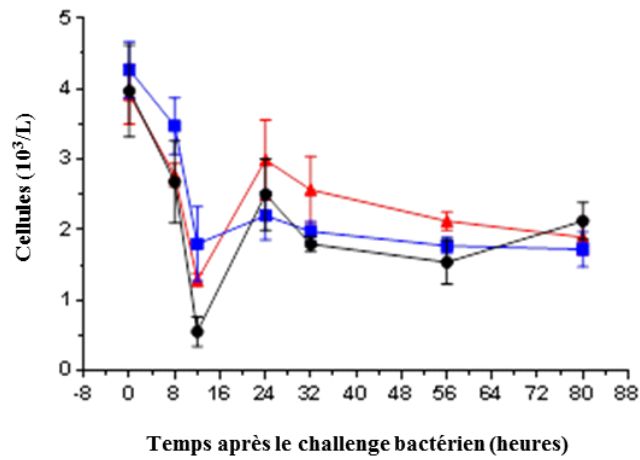


Figure 36 : Moyennes de la concentration des lymphocytes T sanguins suite à une épreuve intra-mammaire avec *E. coli* P4 à 0h chez des vaches primipares ayant reçu l'adjuvant seul ( — ), immunisées par voie intramusculaire ( — ) et immunisées par voie intra-mammaire ( — ). Les barres de dispersion représentent les erreurs-types pour chaque groupe. Les différentes lettres (a, b, c) indiquent les résultats significatifs ( $p < 0,05$ ) respectivement entre les groupes Contrôle et Intramusculaire, les groupes Contrôle et Intra-mammaire et les groupes Intra-mammaire et Intramusculaire.

### PMN sanguins

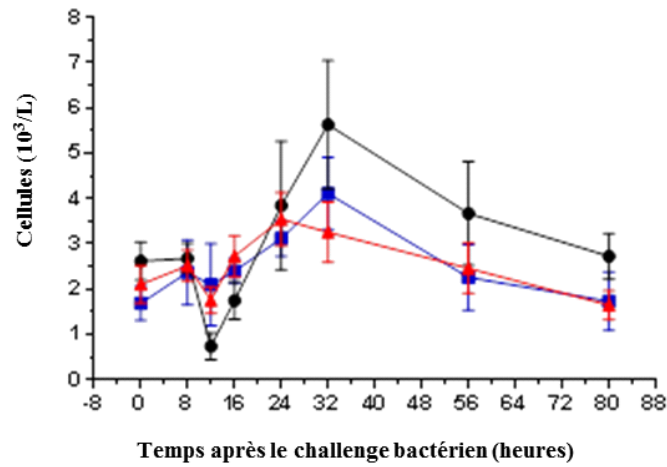


Figure 37 : Moyennes de la concentration des PMN sanguins suite à une épreuve intra-mammaire avec *E. coli* P4 à 0h chez des vaches primipares ayant reçu l'adjuvant seul ( — ), immunisées par voie intramusculaire ( — ) et immunisées par voie intra-mammaire ( — ). Les barres de dispersion représentent les erreurs-types pour chaque groupe. Les différentes lettres (a, b, c) indiquent les résultats significatifs ( $p < 0,05$ ) respectivement entre les groupes Contrôle et Intramusculaire, les groupes Contrôle et Intra-mammaire et les groupes Intra-mammaire et Intramusculaire.

### Monocytes sanguins

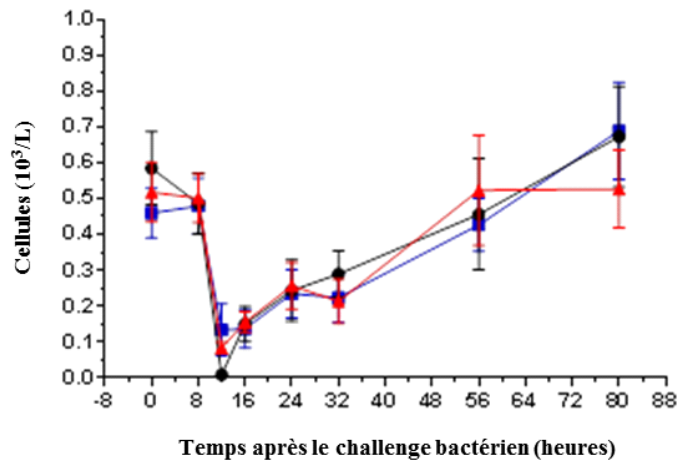


Figure 38 : Moyennes de la concentration des monocytes sanguins suite à une épreuve intramammaire avec *E. coli* P4 à 0h chez des vaches primipares ayant reçu l'adjuvant seul ( — ), immunisées par voie intramusculaire ( — ) et immunisées par voie intra-mammaire ( — ). Les barres de dispersion représentent les erreurs-types pour chaque groupe. Les différentes lettres (a, b, c) indiquent les résultats significatifs ( $p < 0,05$ ) respectivement entre les groupes Contrôle et Intramusculaire, les groupes Contrôle et Intra-mammaire et les groupes Intra-mammaire et Intramusculaire.

A 12h post-inoculation, toutes les vaches, quel que soit leur groupe, ont eu une baisse notable du nombre de leucocytes dans le sang avec une valeur plancher observée à 12h. Cette leucopénie est significativement moins marquée chez les groupes immunisés, IM et IMM comparé au groupe Contrôle ( $p < 0,05$ , Two-way ANOVA, et Mann-Whitney test). Cette leucopénie résulte d'une baisse du nombre de lymphocytes, de neutrophiles et de monocytes dans le sang à cette date.

Après 12h, le nombre de lymphocytes a augmenté pour atteindre un palier qui reste en deçà du nombre de lymphocytes avant l'inoculation. Il n'existe pas de différence significative entre les groupes pour les variations du nombre de lymphocytes sanguins.

A cette même date, le nombre de neutrophiles a augmenté chez toutes les vaches. Toutefois, la neutrophilie semble être plus marquée chez le groupe C à 32h post-inoculation. En effet, le nombre de neutrophiles sanguins est plus élevé pour les vaches de ce groupe, sans pour autant que cette différence soit significative.

## 2.6. Protéines de la phase aiguë

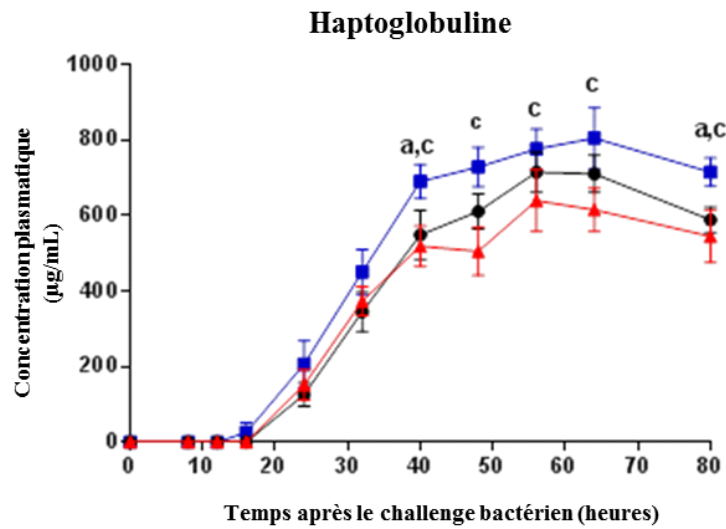


Figure 39 : Moyennes de la concentration plasmatique de l'haptoglobine suite à une épreuve intra-mammaire avec *E. coli* P4 à 0h chez des vaches primipares ayant reçu l'adjuvant seul ( — ), immunisées par voie intramusculaire ( — ) et immunisées par voie intra-mammaire ( — ). Les barres de dispersion représentent les erreurs-types pour chaque groupe. Les différentes lettres (a, b, c) indiquent les résultats significatifs ( $p < 0,05$ ) respectivement entre les groupes Contrôle et Intramusculaire, les groupes Contrôle et Intra-mammaire et les groupes Intra-mammaire et Intramusculaire.

La concentration plasmatique de l'haptoglobine, une protéine de la phase aiguë, a commencé à augmenter 12h après l'inoculation. Cette concentration est significativement plus élevée chez le groupe IM comparée à celle des groupe C et IMM à 40 et 80h post-inoculation ( $p < 0,05$ , Two-way ANOVA, et Mann-Whitney test) et significativement plus élevée chez le groupe IM comparée à celle du groupe IMM à 48, 56 et 64h post-inoculation (respectivement  $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$  and  $p < 0,01$ , Two-way ANOVA).

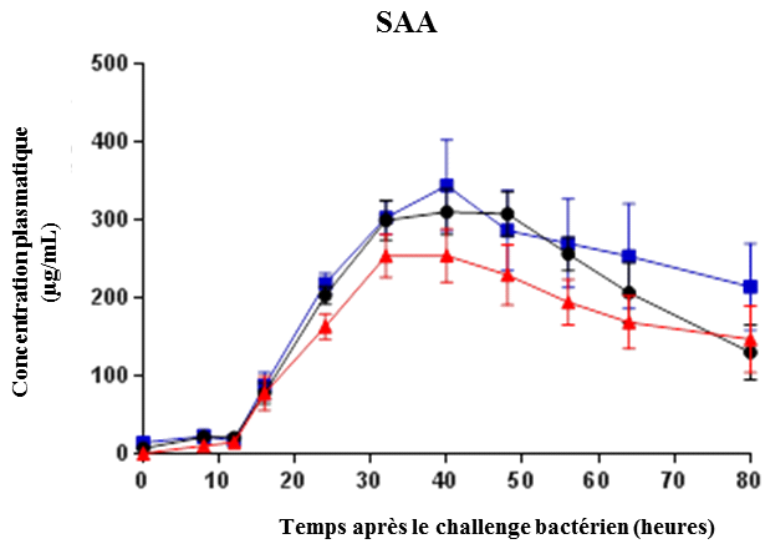


Figure 40 : Moyennes de la concentration plasmatique de la SAA suite à une épreuve intramammaire avec *E. coli* P4 à 0h chez des vaches primipares ayant reçu l'adjuvant seul ( — ), immunisées par voie intramusculaire ( — ) et immunisées par voie intra-mammaire ( — ). Les barres de dispersion représentent les erreurs-types pour chaque groupe. Les différentes lettres (a, b, c) indiquent les résultats significatifs ( $p < 0,05$ ) respectivement entre les groupes Contrôle et Intramusculaire, les groupes Contrôle et Intra-mammaire et les groupes Intra-mammaire et Intramusculaire.

La concentration plasmatique de SAA a augmenté à partir de 12h post-inoculation avec un pic à 40h post-inoculation chez toutes les vaches. Il n'existe pas de différence significative de la concentration plasmatique de SAA entre les groupes durant toute la durée de l'expérience, même si les valeurs mesurées ont tendance à être plus faibles dans le groupe IMM.



## Partie 3 : Discussion

### 1. Signes cliniques et production laitière

L'immunisation, quelle que soit la voie d'administration utilisée, n'a pas permis d'empêcher ni l'infection, ni le développement des signes systémiques et locaux habituellement observés lors de mammite clinique modérée à sévère. Toutefois, les vaches immunisées en utilisant la voie intra-mammaire ont eu des scores cliniques généraux plus faibles. Cette différence est d'autant plus marquée que les vaches immunisées par voie intramusculaire ont eu une deuxième phase d'inflammation mammaire à 48h, avec des scores cliniques plus élevés que les deux autres groupes. L'immunisation par la voie intra-mammaire a permis de réduire la réponse systémique. Ainsi le protocole d'immunisation locale est plus efficace pour la réduction de la sévérité de la mammite. La réduction des signes cliniques systémiques est positivement corrélée à une réduction de la neutropénie et de la lymphopénie. Les signes cliniques moindres sont donc associés à une réponse systémique plus faible, ces observations étant aussi corrélées à la diminution moins forte de la production de lait à la phase aiguë.

D'autres études ont montré l'efficacité d'une immunisation dans la prévention et la réduction des signes cliniques des mammites dues à *E. coli*. Par exemple, l'étude menée par Hogan en 1995 montre que la durée de l'infection mammaire et des signes locaux sont réduits chez les vaches immunisées par rapport aux vaches témoins. En effet, les vaches immunisées avec le vaccin J5 présentaient des scores cliniques plus faibles que les vaches non vaccinées. Toutefois dans cette étude, l'immunisation ne réduit pas l'hyperthermie ou la perte de production laitière, contrairement à notre étude.

Nos résultats contredisent toutefois ceux obtenus dans une étude conduite par Smith (1999). Cette dernière étude a montré que l'immunisation intra-mammaire ne permet pas de diminuer la sévérité des signes cliniques, évalués par la mesure de la température rectale, des CCS, et de la production laitière.

De plus, une étude menée par Wilson en 2007 a comparé la sévérité des signes cliniques entre des vaches vaccinées avec le vaccin J5 et des vaches non vaccinées atteintes de mammites cliniques survenues naturellement (sans épreuve bactérienne) dans trois exploitations laitières. Les résultats ont montré que contrairement à d'autres études antérieures où une inoculation



expérimentale avait été réalisée, la vaccination avec J5 ne permet pas de réduire les signes cliniques, ni la fréquence des mammites dues à des coliformes.

Cette différence de résultat peut s'expliquer par la nature des vaccins ou de l'adjuvant utilisés, de la composition de la fraction antigénique, c'est à dire les bactéries inactivées présentes dans le vaccin. Cependant, il a été démontré que la vaccination avec J5 permet de diminuer le taux de réforme ou la mortalité enregistrée à la suite d'une mammite.

Ce décalage entre les différentes études peut être attribué à des mécanismes pathogéniques différents entre une épreuve expérimentale et l'infection naturelle. Il est en effet connu que l'utilisation de la souche bactérienne *E. coli* 727 provoque des mammites cliniques très sévères. De plus, la préparation du vaccin peut dénaturer des antigènes de surface et ainsi avoir une influence sur son efficacité et le résultat de la protection observée après infection

## **2. Clairance bactérienne et durée de l'infection**

L'immunisation n'a pas permis de réduire la croissance de la bactérie dans le lait ou le nombre maximal de bactéries dans le lait après inoculation. Dans chaque groupe, le nombre de bactéries atteint un maximum environ 8h après l'inoculation. L'élimination des bactéries a été cependant plus rapide chez les vaches immunisées que chez les vaches témoins. De plus, l'efficacité plus élevée de la réponse antibactérienne n'est pas corrélée à une augmentation de la réponse inflammatoire. Au contraire, une diminution plus rapide des scores de l'inflammation locale chez les vaches immunisées correspond à une plus courte durée d'infection mammaire et de la mammite clinique. Ainsi un des effets majeurs de l'immunisation a été de permettre une réduction plus rapide de la concentration d'*E. coli* dans le lait et ainsi la conclusion plus précoce de la mammite.

## **3. CCS, lymphocytes et neutrophiles dans le lait**

Il n'a pas été mis en évidence de différences significatives entre les groupes, excepté au temps 48h, où le groupe Intramusculaire présente un deuxième pic de réponse contrairement aux deux autres groupes.

Ces résultats sont inattendus car ils montrent une absence de renforcement du recrutement des leucocytes dans le lait. Au contraire, les vaches du groupe Contrôle tendent à recruter plus de leucocytes en début d'infection que les vaches immunisées.

L'étude menée par Wilson et ses collègues (2007) a montré que la vaccination avec J5 par voie sous-cutanée permet de réduire la CCS après une épreuve infectieuse mammaire. En effet, ils ont montré que la CCS des vaches vaccinées correspondait à 10% de la CCS des vaches témoins, soit une moyenne de 500 000 cellules/ml pour les vaches vaccinées et 5 000 000 cellules/ml pour les témoins. Cette différence n'a pas été observée dans notre étude pour laquelle les vaches vaccinées et témoins avaient des CCS bien plus élevées sans différence entre les groupes.

### 3.1. La vaccination et la réponse anticorps

La première hypothèse pour le mécanisme d'action du vaccin contre les mammites colibacillaires est une augmentation de la neutralisation et l'opsonisation des bactéries, permise par l'augmentation des titres en anticorps dans le lait et le sérum (Dosogne et al, 2003). C'est en tout cas ce qui a été démontré lors de l'immunisation par le vaccin J5 (Tomita et al, 2000 ; Wilson et al, 2007). Ainsi, il est possible que la vaccination permette une protection contre les cas sévères de mammites coliformes en stimulant la production spécifique d'anticorps contre le « core » de la bactérie. Il en résulte une meilleure opsonisation des bactéries et la neutralisation des effets du LPS. Cependant, le lien entre augmentation des taux d'anticorps et diminution de l'incidence ou de la sévérité de la mammité n'est pas toujours établi. En effet, notre étude a montré que l'activité opsonisante des anticorps ne jouait pas un rôle primordial dans l'issue favorable de l'infection suite à une immunisation. Il est probable que le recrutement plus rapide et efficace des neutrophiles sur le site infectieux ait un impact plus fort sur l'issue d'une mammité colibacillaire sévère (Burton et al, 2003).

### 3.2. La vaccination et la mise en place d'une réponse cellulaire

La vaccination a permis d'orienter la réponse du système immunitaire vers une réponse cellulaire plutôt qu'humorale.

Une étude (Rainard, 1983) a été menée sur cinq vaches immunisées, par voie sous-cutanée et intra-mammaire, dont la réponse a été comparée à celle de vaches témoins. Les résultats ont montré un afflux de leucocytes parmi lesquels les neutrophiles étaient plus nombreux, chez les vaches immunisées que chez des vaches témoins durant les six premières heures de la réponse anti-infectieuse. Ces résultats suggéraient que l'immunisation favorisait le recrutement plus intense de leucocytes et donc une amplification de la réponse cellulaire permettant une meilleure bactéricidie dans le lait au début de la réaction inflammatoire.

Ce recrutement de cellules de l'immunité est permis par une sensibilisation de l'animal à un antigène. L'intensité de la réponse dépend de la concentration de l'antigène administré par voie diathélique et s'accompagne d'une stimulation transitoire de l'activité bactéricide des neutrophiles circulants. Cette sensibilisation de la glande mammaire à un antigène bactérien donné pourrait contribuer à l'élimination des agents pathogènes en début d'infection (Rainard et al, 2003).

Les mécanismes à l'origine de cette sensibilisation sont ceux de l'immunité cellulaire, et en particulier du volet adaptatif de cette réponse. En effet, cette hypothèse est renforcée par le fait que l'administration intra-mammaire d'un complexe anticorps-albumine, associé à du sérum qui représente une source de complément, n'est pas suivi du recrutement de neutrophiles. Ainsi il est possible d'accroître l'intensité du recrutement des neutrophiles vers la glande mammaire en réponse à un antigène particulier suite à une immunisation locale ou systémique. De plus, il semblerait que cette sensibilisation fasse intervenir les lymphocytes T et plus particulièrement les lymphocytes T mémoires. Effectivement, chez la souris, il a été démontré que les lymphocytes T  $CD4^+$  sont nécessaires pour le recrutement des neutrophiles face à une infection mycobactérienne (Appelberg et al, 1992). Il est probable que l'efficacité du vaccin repose sur la présence des lymphocytes T mémoires. L'immunisation locale permettrait un recrutement de cellules mémoires dans la glande mammaire, où ces dernières deviennent résidentes pour une durée qui reste à déterminer.

Enfin, un recrutement intense de neutrophiles ne suffit pas à éliminer rapidement l'agent pathogène. Le pouvoir bactéricide des neutrophiles requiert des opsonines pour reconnaître l'antigène ainsi qu'une activation par les cytokines et les chimiokines de l'inflammation.

#### **4. Protéines de la phase aiguë**

Notre étude montre une augmentation de la concentration sérique de deux protéines de la phase aiguë : l'haptoglobine et la protéine Sérum Amyloïde A3. L'initiation de l'inflammation s'accompagne de la production de protéines de la phase aiguë. La concentration sérique de ces deux protéines augmente lors de mammites colibacillaires (Ohtsuka et al, 2001). Les concentrations d'haptoglobine et de SAA mesurées dans notre étude sont similaires à celles mesurées dans une précédente étude (Suojala et al, 2008). L'immunisation ne semble pas avoir une influence déterminante sur la concentration de ces protéines, comme marqueurs précoces de l'inflammation.

#### **5. Choix de la voie d'administration**

Dans notre étude, il semblerait que la voie intra-mammaire soit plus avantageuse pour la réduction de la sévérité des signes cliniques que la voie intramusculaire. De plus, les vaches vaccinées par voie intramusculaire ont présenté des signes supplémentaires qui n'ont pas été observés chez les vaches des autres groupes, comme par exemple un second pic de la cellularité dans le lait qui a été observé chez le groupe Intramusculaire à 48 h post-inoculation, un pic d'hyperthermie de forte intensité et durable, ou une inflammation locale de la mamelle d'une durée plus longue. Toutefois, ces différences sont indépendantes de l'évolution du nombre de leucocytes sanguins entre les deux groupes immunisés.

Une étude menée par Nickerson a montré que le vaccin dans la région du NL supramammaire induisait une meilleure réponse qu'une injection par voie IM ou SC dans l'encolure. Contrairement à notre étude, la voie d'administration du vaccin n'avait pas d'influence sur le parenchyme mammaire ou sur les signes cliniques. Toutefois, l'infiltration leucocytaire de la mamelle est bien plus marquée chez les vaches vaccinées dans la région mammaire que chez les vaches vaccinées dans l'encolure. De même, les vaches vaccinées dans la région mammaire présentaient un plus grand nombre de cellules produisant des IgG1, IgG2, IgA, and IgM dans le plasma que les vaches vaccinées dans l'encolure. Ces mêmes résultats avaient été obtenus par Smith et Hogan (1999). En effet, l'immunisation intra-mammaire ne permet pas de réduire les signes cliniques de mammites coliformes mais augmente le titre anticorps par comparaison avec les vaches témoins ou les vaches immunisées par voie sous-cutanée.

Une seconde étude a montré qu'un schéma vaccinal comprenant une immunisation intramammaire sept jours après le tarissement, entre deux injections sous-cutanées permet d'obtenir de meilleurs titres anticorps, principalement en IgG et en IgM qu'une vaccination avec trois injections sous-cutanées (Hogan et al, 1997). Ceci suggère qu'une injection locale d'antigènes dans la glande mammaire en involution permet d'améliorer la réponse en anticorps. L'immunisation locale permettrait une plus forte infiltration de cellules de l'immunité (lymphocytes, monocytes, macrophages) dans le parenchyme de la glande mammaire favorisant ainsi une production locale d'anticorps.

Cependant ce phénomène n'a pas été démontré dans l'étude de Tomita (2000). En effet, les titres d'anticorps des vaches vaccinées dans l'encolure ou dans la région mammaire sont similaires. Il est possible que les cellules T résidentes qui colonisent le parenchyme mammaire servent de sentinelle de l'infection et influent sur la qualité de la réponse cellulaire.

## **6. Choix du calendrier vaccinal**

Dans notre étude, le schéma vaccinal se compose de deux injections 8 et 4 semaines avant le vêlage. Toutefois, il est nécessaire de se poser la question de l'utilité d'une éventuelle troisième injection. Il s'agit surtout d'une problématique liée à des aspects financiers et de charges de travail pour l'application de ce protocole vaccinal dans les élevages. Toutefois, les études montrent que la réduction la plus marquée des cas de mammites cliniques colibacillaires est observée lorsque trois injections sont réalisées pour les vaccins commerciaux actuellement disponibles (Wilson, 2003). C'est pourquoi les auteurs recommandent une vaccination avec trois injections. C'est le schéma recommandé pour le seul vaccin contre les mammites actuellement commercialisé en France.

Une autre question est le calendrier des injections vaccinales. Par exemple, le plan vaccinal recommandé avec le vaccin J5 est une injection au tarissement, la deuxième 4 semaines plus tard et la dernière 1 à 7 jours après le vêlage. Les dates du schéma vaccinal que nous avons choisies pour notre étude rejoignent en ce sens celui du vaccin J5. En effet, le taux de nouvelles infections mammaires dues aux coliformes est plus élevé au début de la période sèche et autour du vêlage.

Cependant une étude (Erskine et al, 2007) a montré des effets bénéfiques de l'hyperimmunisation des vaches contre les mammites à *E. coli* pendant la lactation. Ces

vaches hyperimmunisées recevaient, en plus des trois injections du vaccin J5 selon le plan vaccinal classique, trois doses de vaccin supplémentaires durant les trois premiers mois de lactation. Les résultats montrent que ces vaches hyperimmunisées avaient de plus forts titres sériques d'IgG2 anti-J5, ainsi qu'une diminution de l'incidence des mammites cliniques sévères.

Une étude menée par Gurjar en 2013 a testé un plan vaccinal alternatif avec le vaccin J5. Dans cette étude, la vaccination a été réalisée avec trois injections : 15 jours avant le tarissement, le jour du tarissement, puis 15 jours après le tarissement. Les injections ont donc été faites un peu plus tôt par rapport au schéma recommandé. En effet, une modification du plan de vaccination peut être bénéfique afin que la réponse anticorps atteigne un pic lorsque l'incidence des mammites cliniques, principalement colibacillaires, survient, c'est à dire à la fin de la gestation. Or les résultats obtenus ne montrent pas de différences entre les vaches immunisées et les vaches témoins.

## **7. Choix des primipares**

Dans notre étude, le choix s'est porté sur des vaches primipares. En effet, l'utilisation du vaccin peut sembler intéressante chez cette catégorie de vaches car ces dernières représentent 34,4% des effectifs en France ([www.web-agri.fr](http://www.web-agri.fr)). De plus, une vache primipare atteinte de mammite coliforme a plus de risques d'être réformée. Cependant, comme il a été précisé précédemment, les vaches primipares ont moins de risque de développer une mammite coliforme comparativement à des vaches avec des rangs de lactation plus élevés (Smith et al, 1985).

Une étude menée par Vangroenweghe en 2004 a étudié la réponse de vaches primipares suite à une infection intra-mammaire avec deux inocula de la souche d'*E. coli* P4 différents (1 000 UFC et 10<sup>6</sup> UFC). Les résultats ont montré que, malgré les fortes doses inoculées dans la mamelle, les vaches primipares ont une réponse inflammatoire modérée. La réponse clinique est efficace avec un influx rapide des GNN dans les quartiers infectés, une clairance bactérienne efficace et un retour rapide à une production laitière similaire entre les quartiers infectés et non infectés. Les vaches primipares sont plus capables de répondre efficacement à une infection mammaire colibacillaire que les multipares grâce à l'activation précoce du système immunitaire innée.

Toutefois, il semblerait que la vaccination des vaches primipares offre les mêmes résultats que la vaccination des vaches multipares (Hogan, 1999).

## **8. Choix de la souche utilisée lors de l'inoculation intra-mammaire**

La différence entre les résultats obtenus lors des diverses expériences d'infections mammaires par *E. coli* peut aussi s'expliquer par la diversité des souches d'*E. coli* utilisées au moment de l'inoculation.

Dans notre étude, la souche d'*E. coli* P4 utilisée est du type 032:H37. Elle appartient au groupe phylogénétique A (Blum et al, 2012). Elle a déjà été utilisée lors d'autres études expérimentales d'infections de la glande mammaire (Shpigel et al, 1997). Les résultats obtenus lors de notre expérience sont similaires à ceux obtenus lors d'études utilisant cette même souche. Les vaches éprouvées ont eu une mammite clinique avec des signes locaux et généraux suite à la suite d'une phase inflammatoire aiguë. Cette dernière reste transitoire, et est suivie d'une réponse inflammatoire locale prolongée. L'infection a été éliminée spontanément en quelques jours et la réponse inflammatoire s'est atténuée progressivement (Vangroenweghe, 2004).

De plus, les souches encapsulées comme la souche *E. coli* B117 semble causer des mammites avec des signes cliniques plus sévères que les souches non encapsulées telles que la souche P4 car les souches encapsulées sont plus difficilement phagocytées par les cellules de l'immunité.

Il a été démontré que les souches *E. coli* 727 et *E. coli* 157 ont souvent été isolées lors de cas d'infections mammaires modérées à sévères mais brèves. Les souches d'*E. coli* Z et *E. coli* 1470 sont, quant à elles, associées à des infections mammaires persistantes (Richards et al, 2015). En effet, une étude menée par Oliver et ses collaborateurs en 2012 montre que des vaches expérimentalement inoculées par voie mammaire par la souche *E. coli* 1470 ont présenté des signes cliniques modérés sur une plus longue période. De plus, la souche bactérienne persiste plus longtemps dans le lait en dépit d'une CCS élevée. Cette souche serait plus apte à adhérer et à être internalisée dans les cellules de la glande mammaire que les souches *E. coli* 727 et *E. coli* 157.

## CONCLUSION

L'immunisation a un impact favorable sur l'issue des mammites coliformes. De plus, la voie intra-mammaire semble être la voie à privilégier pour l'immunisation car elle permet de limiter l'inflammation tout en accélérant l'élimination de la bactérie de la glande mammaire. En effet, les vaches vaccinées par la voie locale ont montré des signes cliniques généraux moins sévères que chez les vaches immunisées par voie intramusculaire ou non immunisées. En outre, la baisse de la production laitière, critère essentiel pour l'éleveur, est moins intense chez les vaches immunisées par la voie intra-mammaire.

Il semble que la réponse humorale contre les mammites à *E. coli* ne soit pas la réponse la plus efficace pour éliminer les bactéries. En effet, la réponse cellulaire, avec un recrutement de neutrophiles, dont l'activité apparaît plus efficace au site de l'infectieux, joue un rôle primordial dans la protection de la glande mammaire. Cette réponse fait probablement intervenir les cellules mémoires résidentes dans les tissus, qui initieraient le recrutement ou amélioreraient l'efficacité de la réponse induite. Des travaux en cours étudient ces mécanismes afin d'en connaître la genèse et les possibilités futures de manipuler ces réponses.



**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussigné, Gilles FOUCRAS, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Laurine FORGE** intitulée « **Evaluation expérimentale des conséquences de l'immunisation contre *Escherichia Coli* dans la protection vis-à-vis des mammites : effet de la voie d'administration.** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

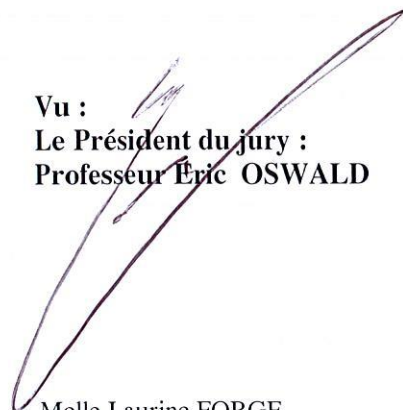
Fait à Toulouse, le 18 novembre 2016  
Professeur Gilles FOUCRAS  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
La Directrice de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Isabelle CHMITELIN

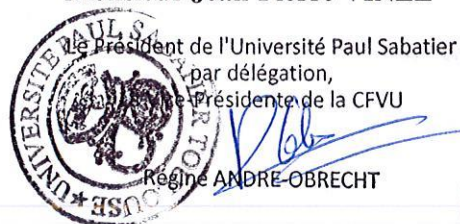


Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Eric OSWALD



Melle Laurine FORGE  
a été admis(e) sur concours en : 2011  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 16/07/2015  
a validé son année d'approfondissement le : 03/11/2016  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Vu et autorisation de l'impression :  
Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Monsieur Jean-Pierre VINEL



Le Président de l'Université Paul Sabatier  
par délégation,  
le Présidente de la CFVU  
Régine ANDRE-OBRECHT

## BIBLIOGRAPHIE

- Appelberg, R. "CD4+ T Cells Are Required for Antigen-Specific Recruitment of Neutrophils by BCG-Immune Spleen Cells." *Immunology* 75, no. 3, March 1992: 414–19.
- Asai, K., K. Kai, H. Rikiishi, S. Sugawara, Y. Maruyama, T. Yamaguchi, M. Ohta, and K. Kumagai. "Variation in CD4+ T and CD8+ T Lymphocyte Subpopulations in Bovine Mammary Gland Secretions during Lactating and Non-Lactating Periods." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 65, no. 1, September 16, 1998: 51–61.
- Bartlett, Paul C., Gay Y. Miller, Susan E. Lance, and Lawrence E. Heider. "Environmental and Managerial Determinants of Somatic Cell Counts and Clinical Mastitis Incidence in Ohio Dairy Herds." *Preventive Veterinary Medicine* 14, no. 3, December 1, 1992: 195–207.
- Bergonier, D. Les mammites, cours de 3<sup>ème</sup> année, ENVT, 2014.
- Berry, E. A., and J. E. Hillerton. "The Effect of an Intramammary Teat Seal on New Intramammary Infections." *Journal of Dairy Science* 85, no. 10, October 2002: 2512–20.
- Berry, E. A. "The Effect of Selective Dry Cow Treatment on New Intramammary Infections." *Journal of Dairy Science* 85, no. 1, January 2002: 112–21.
- Berthelot, X., Bergonier, D. "La maîtrise des mammites cliniques en péripartum : une nouvelle priorité, épidémiologie descriptive et diagnostic." *Le Nouveau Praticien Vétérinaire*, January 2006: 17-21
- Blum, J. W., H. Dosogne, D. Hoeben, F. Vangroenweghe, H. M. Hammon, R. M. Bruckmaier, and C. Burvenich. "Tumor Necrosis Factor-Alpha and Nitrite/nitrate Responses during Acute Mastitis Induced by *Escherichia coli* Infection and Endotoxin in Dairy Cows." *Domestic Animal Endocrinology* 19, no. 4, November 2000: 223–35.
- Blum, Shlomo, Noa Sela, Elimelech D. Heller, Shlomo Sela, and Gabriel Leitner. "Genome Analysis of Bovine-Mastitis-Associated *Escherichia coli* O32:H37 Strain P4." *Journal of Bacteriology* 194, no. 14, July 2012: 3732.
- Botrel, M. A., Arcangioli, M. A., Sulpice, P., Madec, J.Y., Calavas, D., "Fréquence relative des bactéries responsables de mammites et résistance aux antibiotiques : résultats préliminaires d'une étude AFFSA-FEVEC menée en Rhône-Alpes." *Journées Nationales des GTV*, Nantes, 28-30 mai, 2008:879-884.
- Boudry, D. "Traire un lait de qualité du lait : une attention de tous les jours. Qualité Du Lait et Gestion Du Troupeau." *Journée d'étude des AREDB d'Aubel*, 1<sup>er</sup> décembre, 2005.
- Boutet, Philippe, Fabrice Bureau, and Pierre Lekeux. "La mammite bovine : de l'initiation à la

- résolution.” *Annales de Médecine Vétérinaire* 150, no. 1, 2006.
- Brade H., Brade L., Shade U. “Structure, endotoxicity, immunogenicity, antigenicity of bacterial Lipopolysaccharides (endotoxins, O-antigens) in bacterial endotoxins: pathophysiological effects, clinical significances and pharmacological control.” in: Levin J., Buller H. R., Tencate J. W. *Bacterial endotoxins, pathophysiological effects, clinical, significance and pharmacological control*. New York, 1988: 17-45.
- Bradley, A. J., and M. J. Green. “A Study of the Incidence and Significance of Intramammary Enterobacterial Infections Acquired during the Dry Period.” *Journal of Dairy Science* 83, no. 9, September 2000: 1957–65.
- Bradley, A. J., and M. J. Green. “Adaptation of *Escherichia coli* to the Bovine Mammary Gland.” *Journal of Clinical Microbiology* 39, no. 5, May 1, 2001: 1845–49.
- Burton, Jeanne L., and Ronald J. Erskine. “Immunity and Mastitis. Some New Ideas for an Old Disease.” *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 19, no. 1, March 2003: 1–45, v.
- Burvenich, C., M. J. Paape, A. W. Hill, A. J. Guidry, R. H. Miller, R. Heyneman, W. D. Kremer, and A. Brand. “Role of the Neutrophil Leucocyte in the Local and Systemic Reactions during Experimentally Induced E. Coli Mastitis in Cows Immediately after Calving.” *The Veterinary Quarterly* 16, no. 1, March 1994: 45–50.
- Burvenich, Christian, Valérie Van Merris, Jalil Mehrzad, Araceli Diez-Fraile, and Luc Duchateau. “Severity of E. Coli Mastitis Is Mainly Determined by Cow Factors.” *Veterinary Research* 34, no. 5, October 2003: 521–64.
- Bushnell, R. B. “The Importance of Hygienic Procedures in Controlling Mastitis.” *The Veterinary Clinics of North America. Large Animal Practice* 6, no. 2, July 1984: 361–70.
- Butler, J. E. “A Concept of Humoral Immunity among Ruminants and an Approach to Its Investigation.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 137, 1981: 3–55.
- Carroll, Maria V., and Robert B. Sim. “Complement in Health and Disease.” *Advanced Drug Delivery Reviews*, Complement Monitoring of Nanomedicines and Implants, 63, no. 12, September 16, 2011: 965–75.
- Ceciliani, F., J. J. Ceron, P. D. Eckersall, and H. Sauerwein. “Acute Phase Proteins in Ruminants.” *Journal of Proteomics*, Special Issue: Farm Animal Proteomics, 75, no. 14, July 19, 2012: 4207–31.
- Charles A. Janeway, Jr., and Ruslan Medzhitov. “Innate Immune Recognition.” *Annual Review of Immunology* 20, no. 1, 2002: 197–216.
- Colditz, I. G., and D. L. Watson. “The Immunophysiological Basis for Vaccinating Ruminants against Mastitis.” *Australian Veterinary Journal* 62, no. 5, May 1985: 145–53.

- Craven, N. "Generation of Neutrophil Chemoattractants by Phagocytosing Bovine Mammary Macrophages." *Research in Veterinary Science* 35, no. 3, 1983: 310–17.
- Döpfer, D., H. W. Barkema, T. J. G. M. Lam, Y. H. Schukken, and W. Gaastra. "Recurrent Clinical Mastitis Caused by *Escherichia coli* in Dairy Cows." *Journal of Dairy Science* 82, no. 1, January 1, 1999: 80–85.
- Dosogne, Hilde, Frédéric Vangroenweghe, and Christian Burvenich. "Potential Mechanism of Action of J5 Vaccine in Protection against Severe Bovine Coliform Mastitis." *Veterinary Research* 33, no. 1, February 2002: 1–12.
- Durel L, Faroult B, Lepoutre D, Brouillet P, Le Page Ph. "Mammites des bovins (cliniques et subcliniques). Démarches diagnostiques et thérapeutiques." *La Dépêche Technique. Supplément technique* 87, Décembre 2003 to January 2004: 39 p.
- Eberhart, Rj. "Coliform Mastitis." *The Veterinary Clinics of North America. Large Animal Practice* 6, no. 2, 1984 1984: 287–300.
- Eckersall, P. D., F. J. Young, C. McComb, C. J. Hogarth, S. Safi, A. Weber, T. McDonald, A. M. Nolan, and J. L. Fitzpatrick. "Acute Phase Proteins in Serum and Milk from Dairy Cows with Clinical Mastitis." *The Veterinary Record* 148, no. 2, January 13, 2001: 35–41.
- Erskine, R. J., P. C. Bartlett, J. L. VanLente, and C. R. Phipps. "Efficacy of Systemic Ceftiofur as a Therapy for Severe Clinical Mastitis in Dairy Cattle." *Journal of Dairy Science* 85, no. 10, October 2002: 2571–75.
- Erskine, Ronald J., Elizabeth J. VanDyk, Paul C. Bartlett, Jeanne L. Burton, and Michael C. Boyle. "Effect of Hyperimmunization with an *Escherichia coli* J5 Bacterin in Adult Lactating Dairy Cows." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 231, no. 7, October 1, 2007: 1092–97.
- Fagundès, H., Corassin, C. H., Tavolano, P. T., Oliviera, C. A. F. "Milk hygienic practices and occurrence of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in small-scale dairy farms in São Paulo, Brazil." *African Journal of Microbiology Research* 28, 2012:5805-5808.
- Fairbrother, J. H. "Mammite Bovine À *Escherichia coli* : Identification et Caractérisation de La Persistance." Thèse vétérinaire, Université de Montréal, Canada, 2014: 117p.
- Faris, A., K. Krovacek, G. Fröman, and T. Wadström. "Binding of Fibronectin to *Escherichia coli* Isolated from Bovine Mastitis from Different Geographical Regions." *Veterinary Microbiology* 15, no. 1–2, October 1987: 129–36.
- Giguère, S., John F. Prescott, and Patricia M. Dowling, eds. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5th ed. Ames, Iowa, USA: Wiley Blackwell, 2013.

- Godden, S., P. Rapnicki, S. Stewart, J. Fetrow, A. Johnson, R. Bey, and R. Farnsworth. "Effectiveness of an Internal Teat Seal in the Prevention of New Intramammary Infections during the Dry and Early-Lactation Periods in Dairy Cows When Used with a Dry Cow Intramammary Antibiotic." *Journal of Dairy Science* 86, no. 12, December 2003: 3899–3911.
- Goldammer, T., H. Zerbe, A. Molenaar, H.-J. Schuberth, R. M. Brunner, S. R. Kata, and H.-M. Seyfert. "Mastitis Increases Mammary mRNA Abundance of  $\beta$ -Defensin 5, Toll-Like-Receptor 2, TLR2, and TLR4 but Not TLR9 in Cattle." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11, no. 1, January 1, 2004: 174–85.
- Gurjar, Abhijit A., Suzanne Klaessig, Sarah A. Salmon, Robert J. Yancey, and Ynte H. Schukken. "Evaluation of an Alternative Dosing Regimen of a J-5 Mastitis Vaccine against Intramammary *Escherichia coli* Challenge in Nonlactating Late-Gestation Dairy Cows." *Journal of Dairy Science* 96, no. 8, August 2013: 5053–63.
- Gyles, Carlton L., John F. Prescott, J. Glenn Songer, and Charles O. Thoen. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. John Wiley & Sons, 2011.
- Hagiwara, Seiichi, Kouichiro Mori, Hiroyuki Okada, Shin Oikawa, and Hajime Nagahata. "Acute *Escherichia coli* Mastitis in Dairy Cattle: Diagnostic Parameters Associated with Poor Prognosis." *The Journal of Veterinary Medical Science* 76, no. 11, November 2014: 1431–36.
- Harrison, T. R. *Principes de médecine interne, 15ième édition*. Paris, Médecine-Sciences, Flammarion, 2002: 799-803.
- Hill, A. W. "Protective Effect of Previous Intramammary Infection with *Streptococcus Uberis* against Subsequent Clinical Mastitis in the Cow." *Research in Veterinary Science* 44, no. 3, May 1988: 386–87.
- Hill, A. W., D. J. S. Heneghan, and M. R. Williams. "The Opsonic Activity of Bovine Milk Whey for the Phagocytosis and Killing by Neutrophils of Encapsulated and Non-Encapsulated *Escherichia coli* ." *Veterinary Microbiology* 8, no. 3, June 1, 1983: 293–300.
- Hill, A. W. "*Escherichia coli* mastitis." in : Carlton L. Gyles, *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Fourth Edition ed. Escherichia coli in domestic animals and humans*, CAB International, 1994: 117-134.
- Hirsh, D.C., Maclachlan, N.J., Walker, R.L. *Veterinary microbiology. Second Edition*. Blackwell Publishing, Oxford, 2004: 536 pp.
- Hoeben, D., C. Burvenich, E. Trevisi, G. Bertoni, J. Hamann, R. M. Bruckmaier, and J. W. Blum. "Role of Endotoxin and TNF-Alpha in the Pathogenesis of Experimentally Induced Coliform Mastitis in Periparturient Cows." *The Journal of Dairy Research* 67, no. 4, November 2000: 503–14.
- Hogan, J. S., V. L. Bogacz, M. Aslam, and K. L. Smith. "Efficacy of an *Escherichia coli* J5

- Bacterin Administered to Primigravid Heifers.” *Journal of Dairy Science* 82, no. 5, May 1, 1999: 939–43.
- Hogan, J. S., K. L. Smith, K. H. Hoblet, D. A. Todhunter, P. S. Schoenberger, W. D. Hueston, D. E. Pritchard, G. L. Bowman, L. E. Heider, and B. L. Brockett. “Bacterial Counts in Bedding Materials Used on Nine Commercial Dairies.” *Journal of Dairy Science* 72, no. 1, January 1989: 250–58.
- Hogan, J. S., K. L. Smith, P. Schoenberger, S. Romig, and L. Thompson. “Responses of Antibody Titers to Intramammary Immunization with *Escherichia coli* J5 Bacterin.” *Journal of Dairy Science* 80, no. 10, October 1997: 2398–2402.
- Hogan, J. S., D. A. Todhunter, K. L. Smith, and Schoenberger P. S. “Sérum Susceptibility of Coliforms Isolated from Bovine Intramammary Infections.” *Journal of Dairy Science* 72, no. 7, July 1989: 1893–99.
- Hogan, J.S., Todhunter Da, Smith K.L., and Schoenberger P.S. “Sérum Susceptibility of Coliforms Isolated from Bovine Intramammary Infections.” *Journal of Dairy Science* 72, no. 7, 1989: 1893–99.
- Hogan, J. S., D. A. Todhunter, K. L. Smith, P. S. Schoenberger, and R. A. Wilson. “Susceptibility of *Escherichia coli* Isolated from Intramammary Infections to Phagocytosis by Bovine Neutrophils.” *Journal of Dairy Science* 75, no. 12, December 1992: 3324–29.
- Hogan, J. S., W. P. Weiss, and K. L. Smith. “Role of Vitamin E and Selenium in Host Defense against Mastitis.” *Journal of Dairy Science* 76, no. 9, September 1993: 2795–2803.
- Hogan, J. S., W. P. Weiss, K. L. Smith, D. A. Todhunter, P. S. Schoenberger, and L. M. Sordillo. “Effects of an *Escherichia coli* J5 Vaccine on Mild Clinical Coliform Mastitis.” *Journal of Dairy Science* 78, no. 2, February 1995: 285–90.
- Hogan, Joe, and K. Larry Smith. “Coliform Mastitis.” *Veterinary Research* 34, no. 5, September 2003: 507–19.
- Hogan, J. S. et Smith, K. L., Risk factors associated with environmental Mastitis, [www.nmconline.org/articles/riskfactors.htm](http://www.nmconline.org/articles/riskfactors.htm), visité le 31 août 2016.
- Jain, N.C. “Cattle : normal haematology with comments on response to disease.” in Jain N.C., *Schalm’s Veterinary Hematology*, Lea & Febiger, Amsterdam, 1986: 178-207.
- Janeway, Charles A., Kenneth Murphy, Paul Travers, and Mark Walport. *Immunobiologie*. De Boeck Supérieur, Third edition, 2009.
- Kobayashi, Yoshiro. “The Role of Chemokines in Neutrophil Biology.” *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 13, January 1, 2008: 2400–2407.
- Krömker. V, Hauptmann. T, and Bormann. A. “Bacteriological diagnosis with Petrifilm of mastitis pathogens in milk samples from each quarter and bulk milk samples.” *DTW*.

*Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 114, no. 10, 2007: 378–80, 382–83.

- Lam, T. J., L. J. Lipman, Y. H. Schukken, W. Gaastra, and A. Brand. “Epidemiological Characteristics of Bovine Clinical Mastitis Caused by *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia coli* Studied by DNA Fingerprinting.” *American Journal of Veterinary Research* 57, no. 1, January 1996: 39–42.
- Leung-Theung-Long, Stéphane, and Sylvie Guerder. “Les cellules Th17 - Une nouvelle population de cellules T CD4 effectrices pro-inflammatoires.” *Médecine sciences* 24, no. 11, November 1, 2008: 972–76.
- Linton, A. H., and T. C. Robinson. “Studies on the Association of *Escherichia coli* with Bovine Mastitis.” *British Veterinary Journal* 140, no. 4, July 1, 1984: 368–73.
- Lohuis, J. A., W. Kremer, Y. H. Schukken, J. A. Smit, J. H. Verheijden, A. Brand, and A. S. Van Miert. “Growth of *Escherichia coli* in Milk from Endotoxin-Induced Mastitic Quarters and the Course of Subsequent Experimental *Escherichia coli* Mastitis in the Cow.” *Journal of Dairy Science* 73, no. 6, June 1990: 1508–14.
- Mackay, C. R., and W. R. Hein. “A Large Proportion of Bovine T Cells Express the Gamma Delta T Cell Receptor and Show a Distinct Tissue Distribution and Surface Phenotype.” *International Immunology* 1, no. 5, 1989: 540–45.
- Magnuson, N. S., A. G. Spies, M. S. Nissen, C. D. Buck, A. D. Weinberg, P. J. Barr, J. A. Magnuson, and R. Reeves. “Bovine Interleukin 2: Regulatory Mechanisms.” *Veterinary Immunology and Immunopathology* 17, no. 1–4, December 1987: 183–92.
- Manner, Y. “Méthodes de bactériologie des mammites cliniques, bibliographie, étude expérimentale d’un test bactériologique rapide.” Thèse vétérinaire, Université de Nantes, France, 2001: 89p.
- McCarron, J. L., G. P. Keefe, S. L. B. McKenna, I. R. Dohoo, and D. E. Poole. “Laboratory Evaluation of 3M Petrifilms and University of Minnesota Bi-Plates as Potential on-Farm Tests for Clinical Mastitis.” *Journal of Dairy Science* 92, no. 5, May 2009: 2297–2305.
- Mehrzad, J., H. Dosogne, E. Meyer, R. Heyneman, and C. Burvenich. “Respiratory Burst Activity of Blood and Milk Neutrophils in Dairy Cows during Different Stages of Lactation.” *The Journal of Dairy Research* 68, no. 3, August 2001: 399–415.
- Mehrzad, Jalil, Luc Duchateau, Satu Pyörälä, and Christian Burvenich. “Blood and Milk Neutrophil Chemiluminescence and Viability in Primiparous and Pluriparous Dairy Cows during Late Pregnancy, around Parturition and Early Lactation.” *Journal of Dairy Science* 85, no. 12, December 2002: 3268–76.
- Miller, Samuel I., Robert K. Ernst, and Martin W. Bader. “LPS, TLR4 and Infectious Disease Diversity.” *Nature Reviews Microbiology* 3, no. 1, January 2005: 36–46.
- Morin, D.E. “Mammary gland health and disorders”, in: Smith B.P., *Large animal internal medicine 4th ed.*, St Louis, Mo: Mosby Elsevier. Chapter 36, 2009: 1112- 1143

- Nguyen, D. A., and M. C. Neville. "Tight Junction Regulation in the Mammary Gland." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 3, no. 3, July 1998: 233–46.
- Nickerson, S. C., W. E. Owens, and R. L. Boddie. "Effect of a Staphylococcus Aureus Bacterin on Serum Antibody, New Infection, and Mammary Histology in Nonlactating Dairy Cows." *Journal of Dairy Science* 76, no. 5, May 1, 1993: 1290–97.
- Ohtsuka, H., K. Kudo, K. Mori, F. Nagai, A. Hatsugaya, M. Tajima, K. Tamura, F. Hoshi, M. Koiwa, and S. Kawamura. "Acute Phase Response in Naturally Occurring Coliform Mastitis." *The Journal of Veterinary Medical Science* 63, no. 6, June 2001: 675–78.
- Oliver P, Stephen, Susan I. Headrick, Mark J. Lewis, Barbara E. Gillespie, David L. Johnson, and Raul A. Almeida. "Experimental Intramammary Infection with a Strain of *Escherichia coli* Isolated from a Cow with Persistent E. Coli Mastitis." *Open Journal of Veterinary Medicine* 2, no. 4, 2012: 186–90.
- Opdebeeck, J. P., A. J. Frost, and D. O'Boyle. "Adhesion of Staphylococcus Aureus and *Escherichia coli* to Bovine Udder Epithelial Cells." *Veterinary Microbiology* 16, no. 1, January 1988: 77–86.
- Paape, Max J., Douglas D. Bannerman, Xin Zhao, and Jai-Wei Lee. "The Bovine Neutrophil: Structure and Function in Blood and Milk." *Veterinary Research* 34, no. 5, October 2003: 597–627.
- Paape, Max, Jalil Mehrzad, Xin Zhao, Johann Detilleux, and Christian Burvenich. "Defense of the Bovine Mammary Gland by Polymorphonuclear Neutrophil Leukocytes." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 7, no. 2, April 2002: 109–21.
- Pankey, J. W. "Hygiene at Milking Time in the Prevention of Bovine Mastitis." *British Veterinary Journal* 145, no. 5, September 1, 1989: 401–9.
- Pankey, J. W., R. J. Eberhart, A. L. Cuming, R. D. Daggett, R. J. Farnsworth, and C. K. McDuff. "Uptake on Postmilking Teat Antisepsis." *Journal of Dairy Science* 67, no. 6, June 1984: 1336–53.
- Persson Waller, K., I. G. Colditz, S. Lun, and K. Östensson. "Cytokines in Mammary Lymph and Milk during Endotoxin-Induced Bovine Mastitis." *Research in Veterinary Science* 74, no. 1, February 2003: 31–36.
- Pierce, Annick, Dominique Legrand, and Joël Mazurier. "La lactoferrine : une protéine multifonctionnelle." *Médecine sciences* 25, no. 4, April 1, 2009: 361–69.
- Poutrel, B. "La Sensibilité Aux Mammites: Revue Des Facteurs Liés À La Vache." *Ann. Rech. Vét* 14, 1983: 89–104.
- Poutrel, B., Stegeman, MR., Roy, O., Pothier, F., Tilt, N., Payne-Johnson M. "Evaluation of the efficacy of systemic danofloxacin in the treatment of induced acute *E. coli* bovine mastitis." *J. Dairy Res.* 75, 2008:310-318.



- Poutrel, B., Fromageau, A. “Estimation de la prévalence des pathogènes impliqués dans les mammites clinique aiguës.” *Bulletin GTV* 43, 2008:65-68.
- Poutrel, B. “Les mammites colibacillaires chez les vaches laitières.” *Bulletin GTV* 54, 2010: 17–26.
- Rainard, P. “Experimental Mastitis with *Escherichia coli* : Kinetics of Bacteriostatic and Bactericidal Activities.” *Annales De Recherches Veterinaires. Annals of Veterinary Research* 14, no. 1, 1983: 1–11.
- Rainard, Pascal. “Examen Critique Des Approches Vaccinales Pour Lutter Contre Les Mammites Bovines”. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 168 (1), 2015: 61-66.
- Rainard, Pascal, and Céline Riollet. “Innate Immunity of the Bovine Mammary Gland.” *Veterinary Research* 37, no. 3, June 2006: 369–400.
- Rainard, Pascal. “Mobilization of Neutrophils and Defense of the Bovine Mammary Gland.” *Reproduction Nutrition Development* 43, no. 5, September 1, 2003: 439–57.
- Rémy, D. “Traitement des mammites suraiguës.” *Journées Nationales des G.T.V.*, Nantes, 2005: 29-37.
- Rémy, D. “Les mammites.” France Agricole Éditions, Paris, France. 2010: 262 p.
- Richards, Vincent P., Tristan Lefébure, Paulina D. Pavinski Bitar, Belgin Dogan, Kenneth W. Simpson, Ynte H. Schukken, and Michael J. Stanhope. “Genome Based Phylogeny and Comparative Genomic Analysis of Intra-Mammary Pathogenic *Escherichia coli* .” *PLoS ONE* 10, no. 3, March 25, 2015.
- Riollet, C., P. Rainard, and B. Poutrel. “Cells and Cytokines in Inflammatory Secretions of Bovine Mammary Gland.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 480, 2000: 247–58.
- Riollet, C., P. “Differential Induction of Complement Fragment C5a and Inflammatory Cytokines during Intramammary Infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus Aureus*.” *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7, no. 2, March 2000: 161–67.
- Rupp, R., Boichard, D. “Numérations cellulaires du lait et mammites cliniques : relations phénotypiques et génétiques chez les vaches Prim’Holstein.” *INRA Productions Animales* 14, 2001, 193-200
- Saini, V., J. T. McClure, D. Léger, G. P. Keefe, D. T. Scholl, D. W. Morck, and H. W. Barkema. “Antimicrobial Resistance Profiles of Common Mastitis Pathogens on Canadian Dairy Farms.” *Journal of Dairy Science* 95, no. 8, August 2012: 4319–32.
- Schukken, Y. H., B. A. Mallard, J. C. M. Dekkers, K. E. Leslie, and M. J. Stear. “Genetic Impact on the Risk of Intramammary Infection Following *Staphylococcus Aureus* Challenge.” *Journal of Dairy Science* 77, no. 2, February 1, 1994: 639–47.

- Shafer-Weaver, K. A., C. M. Corl, and L. M. Sordillo. "Shifts in Bovine CD4+ Subpopulations Increase T-Helper-2 Compared with T-Helper-1 Effector Cells during the Postpartum Period." *Journal of Dairy Science* 82, no. 8, August 1999: 1696–1706.
- Shafer-Weaver, K. A., G. M. Pighetti, and L. M. Sordillo. "Diminished Mammary Gland Lymphocyte Functions Parallel Shifts in Trafficking Patterns during the Postpartum Period." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine, New York, N.Y.* 212, no. 3, July 1996: 271–80.
- Shamay, A., R. Homans, Y. Fuerman, I. Levin, H. Barash, N. Silanikove, and S. J. Mabjeesh. "Expression of Albumin in Nonhepatic Tissues and Its Synthesis by the Bovine Mammary Gland." *Journal of Dairy Science* 88, no. 2, February 2005: 569–76.
- Shpigel, N. Y., R. Chen, M. Winkler, A. Saran, G. Ziv, and F. Longo. "Anti-Inflammatory Ketoprofen in the Treatment of Field Cases of Bovine Mastitis." *Research in Veterinary Science* 56, no. 1, January 1994: 62–68.
- Shpigel, N. Y., D. Levin, M. Winkler, A. Saran, G. Ziv, and A. Böttner. "Efficacy of Cefquinome for Treatment of Cows with Mastitis Experimentally Induced Using *Escherichia coli* ." *Journal of Dairy Science* 80, no. 2, February 1997: 318–23. doi:10.3168/jds.S0022-0302(9775941-1).
- Shuster, D. E., M. E. Kehrli, P. Rainard, and M. Paape. "Complement Fragment C5a and Inflammatory Cytokines in Neutrophil Recruitment during Intramammary Infection with *Escherichia coli* ." *Infection and Immunity* 65, no. 8, August 1997: 3286–92.
- Smith, J. L., J. S. Hogan, and K. L. Smith. "Efficacy of Intramammary Immunization with an *Escherichia coli* J5 Bacterin." *Journal of Dairy Science* 82, no. 12, December 1999: 2582–88.
- Smith, K. Larry, D. A. Todhunter, and P. S. Schoenberger. "Environmental Mastitis: Cause, Prevalence, Prevention." *Journal of Dairy Science* 68, no. 6, June 1, 1985: 1531–53.
- Smith, K. L., and F. L. Schanbacher. "Lactoferrin as a Factor of Resistance to Infection of the Bovine Mammary Gland." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 170, no. 10 Pt 2, May 15, 1977: 1224–27.
- Sordillo, L. M., M. Campos, and L. A. Babiuk. "Antibacterial Activity of Bovine Mammary Gland Lymphocytes Following Treatment with Interleukin-2." *Journal of Dairy Science* 74, no. 10, October 1991: 3370–75.
- Sordillo, L. M., G. M. Pighetti, and M. R. Davis. "Enhanced Production of Bovine Tumor Necrosis Factor-Alpha during the Periparturient Period." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 49, no. 3, December 1995: 263–70.
- Sordillo, L. M., K. Shafer-Weaver, and D. DeRosa. "Immunobiology of the Mammary Gland." *Journal of Dairy Science* 80, no. 8, August 1, 1997: 1851–65.

- Sordillo, Lorraine M., and Katie L. Streicher. "Mammary Gland Immunity and Mastitis Susceptibility." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 7, no. 2, April 2002: 135–46.
- Srinivasan, Velusamy, Barbara E. Gillespie, Mark J. Lewis, Lien T. Nguyen, Susan I. Headrick, Ynte H. Schukken, and Stephen P. Oliver. "Phenotypic and Genotypic Antimicrobial Resistance Patterns of *Escherichia coli* Isolated from Dairy Cows with Mastitis." *Veterinary Microbiology* 124, no. 3–4, October 6, 2007: 319–28.
- Sprouse, R., H. Garner, Kris Lager, and others. "Cross-Protection of Calves from E. Coli and P. Multocida Endotoxin Challenges via S. Typhimurium Mutant Bacterin-Toxoid." *Agri Pract* 11, no. 2, 1990: 29–34.
- Strandberg, Ylva, Christian Gray, Tony Vuocolo, Laurelea Donaldson, Mary Broadway, and Ross Tellam. "Lipopolysaccharide and Lipoteichoic Acid Induce Different Innate Immune Responses in Bovine Mammary Epithelial Cells." *Cytokine* 31, no. 1, July 7, 2005: 72–86.
- Suojala, Leena, Toomas Orro, Hanna Järvinen, Johanna Saatsi, and Satu Pyörälä. "Acute Phase Response in Two Consecutive Experimentally Induced E. Coli Intramammary Infections in Dairy Cows." *Acta Veterinaria Scandinavica* 50, 2008: 18.
- Suojala, Leena, Tarja Pohjanvirta, Heli Simojoki, Anna-Liisa Myllyniemi, Anna Pitkälä, Sinikka Pelkonen, and Satu Pyörälä. "Phylogeny, Virulence Factors and Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* Isolated in Clinical Bovine Mastitis." *Veterinary Microbiology* 147, no. 3–4, January 27, 2011: 383–88.
- Suriyasathaporn, W., C. Heuer, E. N. Noordhuizen-Stassen, and Y. H. Schukken. "Hyperketonemia and the Impairment of Udder Defense: A Review." *Veterinary Research* 31, no. 4, August 2000: 397–412.
- Tadoka, K., Akira, S. "Tool-like receptors in innate immunity." *International Immunology*, no. 17, 2005: 1-14.
- Taylor, B. C., J. D. Dellinger, J. S. Cullor, and J. L. Stott. "Bovine Milk Lymphocytes Display the Phenotype of Memory T Cells and Are Predominantly CD8+." *Cellular Immunology* 156, no. 1, June 1994: 245–253.
- Todhunter, D. A., K. L. Smith, J. S. Hogan, and P. S. Schoenberger. "Gram-Negative Bacterial Infections of the Mammary Gland in Cows." *American Journal of Veterinary Research* 52, no. 2, February 1991: 184–88.
- Tomita, G. M., C. H. Ray, S. C. Nickerson, W. E. Owens, and G. F. Gallo. "A Comparison of Two Commercially Available *Escherichia coli* J5 Vaccines against E. Coli Intramammary Challenge." *Journal of Dairy Science* 83, no. 10, October 2000: 2276–81.
- Vangroenweghe, F., L. Duchateau, and C. Burvenich. "Moderate Inflammatory Reaction during Experimental *Escherichia coli* Mastitis in Primiparous Cows." *Journal of Dairy Science* 87, no. 4, April 2004: 886–95.

- Vangroenweghe, F. “Experimentally Induced *Escherichia coli* Mastitis in Lactating Primiparous Cows.” Thèse Universitaire, Université de Gand, Belgique, 2004: 237p.
- Vergonjeanne, R., “Résultats du contrôle laitier 2013. La production par vache en baisse, tout comme le nombre d'élevages.” Avril 2014.  
<http://www.web-agri.fr/conduite-elevage/genetique-race/article/la-production-par-vache-en-baisse-tout-comme-le-nombre-d-elevages-1175-99677.htm>, consulté le 18 septembre 2016.
- Wagner, S., Erskine, R. “Antimicrobial drug use in bovine mastitis.” in: Giguère S, Prescott JD, Baggot RD, et al, *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine Fourth Edition*, Oxford, Blackwell, 2006: 507-510.
- Wallace, Jodi A. “Diagnostiquer la mammité.” *Le producteur de lait québécois*, September 2007: 47-49.
- Wallace, Jodi A., Émile Bouchard, Luc DesCôteaux, Serge Messier, Denis DuTremblay, and Jean-Philippe Roy. “Comparison of Results for Commercially Available Microbiological Media Plates with Results for Standard Bacteriologic Testing of Bovine Milk.” *American Journal of Veterinary Research* 72, no. 12, December 2011: 1622–30.
- Waller, K. P. “Mammary Gland Immunology around Parturition. Influence of Stress, Nutrition and Genetics.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 480, 2000: 231–45.
- Wenz, J. R., G. M. Barrington, F. B. Garry, R. P. Dinsmore, and R. J. Callan. “Use of Systemic Disease Signs to Assess Disease Severity in Dairy Cows with Acute Coliform Mastitis.” *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218, no. 4, February 15, 2001: 567–72.
- Wenz, John R., Franklyn B. Garry, and George M. Barrington. “Comparison of Disease Severity Scoring Systems for Dairy Cattle with Acute Coliform Mastitis.” *Journal of the American Veterinary Medical Association* 229, no. 2, July 15, 2006: 259–62.
- Wilson, D. J., Gonzales, R. N. “Vaccination strategies for reducing clinical severity of coliform mastitis.” *Veterinary Clinics of North America : Food Animal Practice* 90, no. 9, September 2007: 4282–88.
- Wilson, D. J., Y. T. Grohn, G. J. Bennett, R. N. González, Y. H. Schukken, and J. Spatz. “Comparison of J5 Vaccinates and Controls for Incidence, Etiologic Agent, Clinical Severity, and Survival in the Herd Following Naturally Occurring Cases of Clinical Mastitis.” *Journal of Dairy Science* 90, no. 9, September 2007: 4282–88.
- Wilson, David J., Bonnie A. Mallard, Jeanne L. Burton, Ynte H. Schukken, and Yrjo T. Gröhn. “Milk and Serum J5-Specific Antibody Responses, Milk Production Change, and Clinical Effects Following Intramammary *Escherichia coli* Challenge for J5 Vaccinate and Control Cows.” *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 14, no. 6, June 2007: 693–99.

Zadoks, Ruth N., John R. Middleton, Scott McDougall, Jorgen Katholm, and Ynte H. Schukken. "Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 16, no. 4, December 2011: 357–72.

Zanetti, Margherita. "The Role of Cathelicidins in the Innate Host Defenses of Mammals." *Current Issues in Molecular Biology* 7, no. 2, 2005: 179–196.

## ANNEXES

### Annexe 1 : Présentation d'un extrait de la feuille de renseignement concernant l'examen de la mamelle et du lait

<b>Examen de la mamelle</b>	
<b>QUARTIER AVANT GAUCHE</b> <u>Couleur</u> : Normale/claire <b>0</b> <input type="checkbox"/> Rouge <b>1</b> <input type="checkbox"/> Bleue <b>2</b> <input type="checkbox"/> <u>Douleur</u> : Absente <b>0</b> <input type="checkbox"/> Modérée <b>1</b> <input type="checkbox"/> Marquée <b>2</b> <input type="checkbox"/> <u>Chaleur</u> : Normale <b>0</b> <input type="checkbox"/> Chaude <b>1</b> <input type="checkbox"/> Très chaude <b>2</b> <input type="checkbox"/> <u>Induration</u> : Aucune <b>0</b> <input type="checkbox"/> Induré <b>1</b> <input type="checkbox"/> Très induré <b>2</b> <input type="checkbox"/> <u>Gonflement</u> : Aucun <b>0</b> <input type="checkbox"/> 1,5 fois <b>1</b> <input type="checkbox"/> 2 fois <b>2</b> <input type="checkbox"/>	<b>QUARTIER AVANT DROIT</b> <u>Couleur</u> : Normale/claire <b>0</b> <input type="checkbox"/> Rouge <b>1</b> <input type="checkbox"/> Bleue <b>2</b> <input type="checkbox"/> <u>Douleur</u> : Absente <b>0</b> <input type="checkbox"/> Modérée <b>1</b> <input type="checkbox"/> Marquée <b>2</b> <input type="checkbox"/> <u>Chaleur</u> : Normale <b>0</b> <input type="checkbox"/> Chaude <b>1</b> <input type="checkbox"/> Très chaude <b>2</b> <input type="checkbox"/> <u>Induration</u> : Aucune <b>0</b> <input type="checkbox"/> Induré <b>1</b> <input type="checkbox"/> Très induré <b>2</b> <input type="checkbox"/> <u>Gonflement</u> : Aucun <b>0</b> <input type="checkbox"/> 1,5 fois <b>1</b> <input type="checkbox"/> 2 fois <b>2</b> <input type="checkbox"/>
<b>QUARTIER ARRIERE GAUCHE</b> <u>Couleur</u> : Normale/claire <b>0</b> <input type="checkbox"/> Rouge <b>1</b> <input type="checkbox"/> Bleue <b>2</b> <input type="checkbox"/> <u>Douleur</u> : Absente <b>0</b> <input type="checkbox"/> Modérée <b>1</b> <input type="checkbox"/> Marquée <b>2</b> <input type="checkbox"/> <u>Chaleur</u> : Normale <b>0</b> <input type="checkbox"/> Chaude <b>1</b> <input type="checkbox"/> Très chaude <b>2</b> <input type="checkbox"/> <u>Induration</u> : Aucune <b>0</b> <input type="checkbox"/> Induré <b>1</b> <input type="checkbox"/> Très induré <b>2</b> <input type="checkbox"/> <u>Gonflement</u> : Aucun <b>0</b> <input type="checkbox"/> 1,5 fois <b>1</b> <input type="checkbox"/> 2 fois <b>2</b> <input type="checkbox"/>	<b>QUARTIER ARRIERE DROIT</b> <u>Couleur</u> : Normale/claire <b>0</b> <input type="checkbox"/> Rouge <b>1</b> <input type="checkbox"/> Bleue <b>2</b> <input type="checkbox"/> <u>Douleur</u> : Absente <b>0</b> <input type="checkbox"/> Modérée <b>1</b> <input type="checkbox"/> Marquée <b>2</b> <input type="checkbox"/> <u>Chaleur</u> : Normale <b>0</b> <input type="checkbox"/> Chaude <b>1</b> <input type="checkbox"/> Très chaude <b>2</b> <input type="checkbox"/> <u>Induration</u> : Aucune <b>0</b> <input type="checkbox"/> Induré <b>1</b> <input type="checkbox"/> Très induré <b>2</b> <input type="checkbox"/> <u>Gonflement</u> : Aucun <b>0</b> <input type="checkbox"/> 1,5 fois <b>1</b> <input type="checkbox"/> 2 fois <b>2</b> <input type="checkbox"/>

## Examen du lait

QUARTIER AVANT GAUCHE	QUARTIER AVANT DROIT
<p><u>Couleur:</u>    Blanc <input type="checkbox"/>    Blanc-jaune décoloré <input type="checkbox"/>                              Rouge <input type="checkbox"/>    Autre <input type="checkbox"/></p> <p><u>Caractéristiques macroscopique :</u>            Normal <b>0</b> <input type="checkbox"/>            Normal avec caillots et flocons <b>1</b> <input type="checkbox"/>            Aspect de sérum avec caillots et flocons <b>2</b> <input type="checkbox"/></p> <p><u>CMT:</u> - <input type="checkbox"/>    + <input type="checkbox"/>    ++ <input type="checkbox"/>    +++ <input type="checkbox"/></p>	<p><u>Couleur:</u>    Blanc <input type="checkbox"/>    Blanc-jaune décoloré <input type="checkbox"/>                              Rouge <input type="checkbox"/>    Autre <input type="checkbox"/></p> <p><u>Caractéristiques macroscopique :</u>            Normal <b>0</b> <input type="checkbox"/>            Normal avec caillots et flocons <b>1</b> <input type="checkbox"/>            Aspect de sérum avec caillots et flocons <b>2</b> <input type="checkbox"/></p> <p><u>CMT:</u> - <input type="checkbox"/>    + <input type="checkbox"/>    ++ <input type="checkbox"/>    +++ <input type="checkbox"/></p>
QUARTIER ARRIERE GAUCHE	QUARTIER ARRIERE DROIT
<p><u>Couleur:</u>    Blanc <input type="checkbox"/>    Blanc-jaune décoloré <input type="checkbox"/>                              Rouge <input type="checkbox"/>    Autre <input type="checkbox"/></p> <p><u>Caractéristiques macroscopique :</u>            Normal <b>0</b> <input type="checkbox"/>            Normal avec caillots et flocons <b>1</b> <input type="checkbox"/>            Aspect de sérum avec caillots et flocons <b>2</b> <input type="checkbox"/></p> <p><u>CMT:</u> - <input type="checkbox"/>    + <input type="checkbox"/>    ++ <input type="checkbox"/>    +++ <input type="checkbox"/></p>	<p><u>Couleur:</u>    Blanc <input type="checkbox"/>    Blanc-jaune décoloré <input type="checkbox"/>                              Rouge <input type="checkbox"/>    Autre <input type="checkbox"/></p> <p><u>Caractéristiques macroscopique :</u>            Normal <b>0</b> <input type="checkbox"/>            Normal avec caillots et flocons <b>1</b> <input type="checkbox"/>            Aspect de sérum avec caillots et flocons <b>2</b> <input type="checkbox"/></p> <p><u>CMT:</u> - <input type="checkbox"/>    + <input type="checkbox"/>    ++ <input type="checkbox"/>    +++ <input type="checkbox"/></p>

### Résultat score clinique par quartier :

<b>0-2</b>	Légère
<b>3-5</b>	Modérée
<b>6-9</b>	Sévère





**Nom, Prénom** : Forge Laurine

**Titre** : ÉVALUATION EXPÉRIMENTALE DES CONSÉQUENCES DE L'IMMUNISATION CONTRE *ESCHERICHIA COLI* DANS LA PROTECTION VIS-A-VIS DES MAMMITES : EFFET DE LA VOIE D'ADMINISTRATION

**Résumé** :

Les mammites à *E. coli* sont fréquentes, et leur sévérité clinique est variable. La vaccination est une des stratégies qui pourrait permettre de réduire la fréquence et la sévérité de ces infections. Son mode d'action n'est pas suffisamment documenté, et la réponse immunitaire protectrice est encore assez mal comprise. Afin d'améliorer nos connaissances à propos de l'immunité de la mamelle, dix-huit génisses Prim'Hostein immunisées soit par voie intramusculaire, soit par voie intra-mammaire avec la souche P4 d'*E. coli* ont été infectées expérimentalement avec la même souche. Un troisième groupe de génisses ayant reçu l'adjuvant seul correspond au groupe témoin. L'immunisation locale modifie favorablement l'issue de l'infection, en améliorant la clairance bactérienne et en limitant l'inflammation. Les signes cliniques systémiques sont eux aussi réduits. L'élimination de la bactérie n'est pas liée à une augmentation de l'activité opsonisante et de la phagocytose dans le lait, suggérant que les anticorps ne jouent pas un rôle majeur, et que l'immunité à médiation cellulaire est la clé dans la compréhension de la protection vaccinale de la glande mammaire.

**Mots-clés** : *Escherichia coli*, mammite, immunisation, voie d'administration, vache.

---

**Name** : Forge Laurine

**Title** : CONSEQUENCES OF THE EXPERIMENTAL IMMUNIZATION AGAINST *ESCHERICHIA COLI* IN THE PROTECTION AGAINST MASTITIS : EFFECT OF THE ROUTE OF ADMINISTRATION.

**Abstract** :

Clinical mastitis caused by *E. coli* are frequent and exhibit a wide range of disease severity, from mild and local inflammation, to very severe with altered general conditions. Vaccination is one of the strategies for limiting frequency and disease severity. The mode of action is not sufficiently documented, and protective immune response of the mammary gland against *E. coli* is not well understood. To improve our knowledge of the mammary gland immune protection, eighteen Prim'Hostein heifers were immunized either intramuscularly or intramammarily with *E. coli* strain P4 and further submitted to a homologous mammary challenge. A third group of mock-immunized (adjuvant only) cows is considered as challenge controls. Local immunization modified favorably the outcome of infection, by improving bacterial clearance while limiting local inflammation. Systemic clinical signs were also contained. Bacterial clearance was not associated to an increase in the initial efficiency of opsonophagocytic activity in milk. Antibodies did not play a major role, and cell-mediated immunity is probably the key to understanding vaccine-induced protection of the mammary gland.

**Key words** : *Escherichia coli*, mastitis, immunization, route of administration, cows.