



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 : 19422

To cite this version :

Liard, Mathilde. *Analyses bactériologiques et cellulaires des échantillons de lait chez des chèvres après sélection divergente sur la résistance aux mammites*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017, 126 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

ANALYSES BACTÉRIOLOGIQUES ET CELLULAIRES DES ÉCHANTILLONS DE LAIT CHEZ DES CHÈVRES APRÈS SÉLECTION DIVERGENTE SUR LA RÉSISTANCE AUX MAMMITES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

par

LIARD, Mathilde

Née, le 26 avril 1991 à JOIGNY (89)

Directeur de thèse : M. Gilles FOUCRAS

JURY

PRESIDENT :
M. Éric OSWALD

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS
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 :
Mme Rachel RUPP

Docteur en génétique à l'Institut National de la Recherche Agronomique de
TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directrice : Madame Isabelle CHMITELIN

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*
- Mme CLAUW Martine, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie Pathologique*
- M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
- M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. MILON Alain, *Microbiologie moléculaire*
- M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
- M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*
- M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, *Pathologie de la Reproduction*
- M. DUCOS Alain, *Zootchnie*
- M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie des ruminants*
- Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme HAGEN-PICARD, Nicole, *Pathologie de la reproduction*
- M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*
- M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
- M. PICALET Dominique, *Pathologie infectieuse*
- M. SANS Pierre, *Productions animales*
- Mme TRUMEL Catherine, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme CADIARGUES Marie-Christine, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. GUERIN Jean-Luc, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme LACROUX Caroline, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
Mme **SABY-CHABAN Claire**, *Gestion de la santé des troupeaux bovins*

Remerciements

À Monsieur le Professeur Eric OSWALD

Professeur des Universités
Praticien hospitalier
Bactériologie

Qui nous a fait le plus grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,
Hommages respectueux.

À Monsieur le Professeur Gilles FOUCRAS

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie du Bétail

Qui nous a fait l'honneur de diriger cette thèse.
Pour ses conseils avisés, sa disponibilité et ses encouragements tout au long de ce travail,
Qu'il trouve ici, l'expression de mes remerciements les plus sincères.

À Monsieur le Docteur Dominique BERGONIER

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie de la Reproduction

Qui nous a fait l'honneur de faire partie de ce jury de thèse,
Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

À Madame le Docteur Rachel RUPP,

Sans qui cette thèse et ce beau projet n'existeraient pas.
Pour son aide très précieuse et la disponibilité qu'elle a su m'accorder malgré ses nombreux autres travaux.
Qu'elle trouve ici l'expression de mon respect.

Table des matières

Table des illustrations	7
Table des annexes	9
Liste des abréviations	10
Introduction	11
Chapitre I : Etude bibliographique	13
1. IMPORTANCE DES MAMMITES EN ELEVAGE CAPRIN LAITIER	14
1.1. Conséquences économiques	14
1.2. Aspect sanitaire	15
2. GESTION DES MAMMITES EN ELEVAGE CAPRIN	16
2.1. Prévention des mammites	16
2.1.1. Mesures hygiéniques de la traite	16
2.1.2. Hygiène du logement	17
2.1.3. Vaccination	18
2.1.4. Sélection génétique	19
2.2. Détection des mammites	21
2.2.1. Méthodes indirectes	22
2.2.1.1. Methodes basées sur le comptage des cellules somatiques	22
2.2.1.1.1. California Mastitis Test (CMT)	22
2.2.1.1.2. Comptage microscopique par méthode colorimétrique	23
2.2.1.1.3. Comptage électronique des particules (type Coulter Counter)	23
2.2.1.1.4. Comptage par cytométrie en flux (type Fossomatic®)	24
2.2.1.1.5. Cytométrie en flux basée sur la fluorescence	25
2.2.1.2. Autres méthodes	27
2.2.1.2.1. Conductivité électrique	27
2.2.1.2.2. Méthodes de dosages	27
2.2.2. Bactériologie du lait	29
2.2.2.1. Méthode conventionnelle	29
2.2.2.2. Méthode moléculaire par PCR quantitative	30
3. EPIDEMIOLOGIE DES MAMMITES CHEZ LA CHEVRE	32
3.1. Prévalence des infections intra-mammaires et des germes isolés	32
3.1.1. Prévalence des mammites cliniques et les germes responsables	32
3.1.2. Prévalence des mammites subcliniques et des germes associés	32
3.2. Présentation des bactéries responsables des mammites caprines	33

3.2.1.	Les Staphylocoques	33
3.2.1.1.	Les Staphylocoques Coagulase Positifs (SCP)	33
3.2.1.2.	Les Staphylocoques Coagulase Négatifs (SCN)	34
3.2.2.	Les autres bactéries.....	35
3.2.2.1.	Les Streptocoques	35
3.2.2.2.	Les Corynébactéries	35
3.2.2.3.	Les Entérobactéries	36
3.2.2.4.	Les autres bactéries à Gram négatif	36
3.2.2.5.	Les mycoplasmes	36
3.3.	Le Virus de l'Arthrite-Encéphalite Caprine (CAEV)	36
4.	PHYSIOPATHOLOGIE DES MAMMITES CAPRINES	37
4.1.	Les défenses vis-à-vis des infections mammaires	37
4.1.1.	Défenses anatomiques	37
4.1.2.	Défenses immunitaires.....	39
4.1.2.1.	La réponse humorale	39
4.1.2.2.	La réponse cellulaire	40
4.1.2.2.1.	Les macrophages.....	40
4.1.2.2.2.	Les neutrophiles	41
4.1.2.2.3.	Les lymphocytes	42
4.2.	Conséquences de l'inflammation mammaire sur les caractéristiques du lait.....	43
4.2.1.	La concentration de cellules somatiques (CCS).....	43
4.2.1.1.	Différenciation des cellules somatiques chez la chèvre	43
4.2.1.2.	Facteurs de variation physiologiques	44
4.2.1.2.1.	Les facteurs liés à l'animal.....	44
4.2.1.2.2.	Les facteurs liés à la traite	45
4.2.1.2.3.	Les facteurs liés à la conduite d'élevage	46
4.2.1.3.	Facteurs de variation pathologiques : les infections mammaires	46
4.2.2.	Influence des mammites sur les autres paramètres du lait.....	48
Chapitre 2 : Etude expérimentale		50
1.	MATERIEL ET METHODES.....	51
1.1.	Procréation des animaux.....	51
1.1.1.	L'élevage.....	51
1.1.2.	Les lignées divergentes.....	51
1.2.	Les prélèvements.....	52

1.3.	Analyse des échantillons de lait	53
1.3.1.	Détermination des CCS.....	53
1.3.2.	La cytométrie en flux (FACS).....	53
1.3.3.	Bactériologie.....	54
1.1.4.	Analyses statistiques.....	54
2.	RESULTATS	55
2.1.	Composition cellulaire	55
2.2.	Profils cellulaires en fonction de la lignée et du statut infectieux.....	56
2.3.	Evolution de la proportion de chaque type cellulaire en fonction de la CCS	58
2.4.	Facteurs influençant le profil cellulaire liés à l'animal	59
2.4.1.	Effet de la lignée.....	60
2.4.2.	Effet du stade de lactation	60
2.4.3.	Effet du rang de lactation.....	61
2.4.4.	Effet de l'âge.....	61
2.4.5.	Effet du côté de l'hémimamelle	61
2.4.6.	Effet croisé du stade de lactation et de la lignée	61
2.5.	Etiologie des bactéries associées aux infections intra mammaires	63
2.5.1.	Distinction selon la lignée.....	68
2.5.1.1.	<i>Bactériologie conventionnelle</i>	63
2.5.1.2.	<i>Bactériologie moléculaire</i>	66
2.5.2.	Distinction selon le stade de lactation	68
2.5.2.1.	<i>Bactériologie conventionnelle</i>	68
2.5.2.2.	<i>Bactériologie moléculaire</i>	70
2.5.3.	Comparaison des résultats obtenus avec les deux méthodes	71
2.6.	Facteurs liés à l'agent pathogène influençant le profil cellulaire	72
2.6.1.	Effet de l'espèce bactérienne	72
2.6.2.	Effet du nombre de bactéries.....	73
2.6.3.	Effet croisé de l'espèce et du nombre de bactéries.....	74
2.6.4.	Effet de l'agent pathogène en fonction de la lignée	76
2.7.	Facteurs influençant les paramètres de production.....	78
2.7.1.	Les facteurs liés à l'animal.....	78
2.7.2.	Les facteurs liés à l'agent infectieux.....	79
3.	DISCUSSION.....	81
3.1.	Distribution des types cellulaires dans le lait de chèvre	81
3.2	Influence des caractéristiques liées à l'animal sur le profil cellulaire	82

3.2.1.	Effet lignée	82
3.2.2.	Autres effets liés à l'animal	84
3.3.	Etude bactériologique des échantillons de lait.....	86
3.3.1.	Bactériologie conventionnelle	86
3.3.2.	Bactériologie moléculaire.....	88
3.4.	Influence des caractéristiques liées à l'agent bactérien sur le profil cellulaire	90
3.5.	Evolution de la réponse inflammatoire locale et de l'infection au cours de la lactation	94
3.6.	Impact de la sélection génétique sur les caractères de production laitière	97
Conclusion	99
Références bibliographiques	101
Annexes	114

Table des illustrations

Figure 1 : Variabilité de la conformation mammaire chez des chèvres de notre étude.....	18
Figure 2 : Nombre de bactéries et SCS hémi-mamelle selon la lignée	20
Figure 3 : Comparaison des modes de sécrétion du lait de la chèvre et de la brebis	24
Figure 4 : Répartition des cellules contenues dans le lait d'une chèvre de notre étude en fonction de leurs SSC et de leurs FSC.....	25
Figure 5 : Données FACS du lait d'une chèvre de notre étude, obtenues après marquage par SYTO 13®.....	26
Figure 6 : Exemple de la détermination du Ct en fonction de la fluorescence et du nombre de cycles d'amplification	31
Figure 7 : Coupe sagittale de la glande mammaire de la chèvre	37
Figure 8 : Composition des cellules somatiques dans chaque lignée de chèvres	56
Figure 9 : Décompte de chaque type cellulaire en fonction de la lignée et du statut infectieux des chèvres.....	57
Figure 10 : Concentration en PMN en fonction de la CCS à l'échelle logarithmique avec la courbe de tendance associée	58
Figure 11 : Concentration en lymphocytes en fonction de la CCS à l'échelle logarithmique avec la courbe de tendance associée	59
Figure 12 : Décompte de chaque type cellulaire en fonction de la lignée et du stade de lactation	62
Figure 13 : Prévalence des différentes espèces bactériennes en fonction de la lignée	64
Figure 14 : Moyennes des mesures de la concentration des différentes espèces bactériennes isolées en bactériologie conventionnelle.....	66
Figure 15 : Distribution de la charge bactérienne en staphylocoques mesurée en bactériologie moléculaire	67
Figure 16 : Dénombrement des staphylocoques (en logarithme binaire d'équivalents génomes) par la technique de bactériologie moléculaire en fonction du type de bactérie identifié en bactériologie conventionnelle	71
Figure 17 : Effet de l'espèce bactérienne sur la CCS	73
Figure 18 : SCS en fonction de la catégorie d'agent infectieux.....	75
Figure 19 : Décompte de chaque type cellulaire en fonction de l'espèce de bactérie et de sa quantité	75
Figure 20 : Dénombrement des différents types de leucocytes en fonction du statut infectieux et de la lignée	77
Figure 21 : Variation du taux protéique selon la catégorie d'agent bactérien	80

Tableau I : Distribution des principales espèces de SCN isolées dans les études publiées.....	34
Tableau II : Significativité des effets liés à l'animal sur les concentrations des différents types de leucocytes	60
Tableau III : Inventaire des germes isolés des échantillons de lait collectés dans notre étude.....	63
Tableau IV : Taux d'infection détecté par la bactériologie conventionnelle selon la date de prélèvement	68
Tableau V : Prévalence des différentes espèces bactériennes selon la date de prélèvement.....	68
Tableau VI : Agents pathogènes isolés sur au moins 2 prélèvements consécutifs sur une même hémimamelle et lignée de la chèvre correspondante	69
Tableau VII : Quantité de staphylocoques détectés par mL (SD) et taux d'infection par bactériologie moléculaire selon la date de prélèvement.....	70
Tableau VIII : Corrélation entre le nombre de cellules de chaque type et le nombre de bactéries dénombrées par les deux techniques de bactériologie.....	74
Tableau IX : Significativité de différences entre certaines catégories de la Figure 20	77
Tableau X : Significativité des effets liés à l'animal sur les paramètres de production.....	79

Table des annexes

Annexe 1 : Evolution du SCS hemi-mamelle (moyennes et écart-types) au cours de la lactation selon la lignée et la campagne	114
Annexe 2 : Critère de notation du CMT	114
Annexe 3 : Principe de focalisation hydrodynamique par un liquide vecteur pour réaliser une cytométrie en flux	115
Annexe 4 : Principe de détection du signal lumineux frontal et de la fluorescence latérale	115
Annexe 5 : Prévalence et étiologie des IIM subcliniques de la chèvre laitière.....	117
Annexe 6 : Voies d'activation du complément.....	118
Annexe 7 : CCS en fonction du pourcentage de neutrophiles avec la courbe de tendance associée. Chaque point représente un quartier	119
Annexe 8 : CCS en fonction du pourcentage de neutrophile avec la courbe de tendance associée. Chaque point représente un quartier	119
Annexe 9 : Effet du stade de lactation sur la CCS individuelle en fonction du statut infectieux de la mamelle des chèvres.....	120
Annexe 10 : Exemple de variation journalière de SCC du lait d'une chèvre Alpine	120
Annexe 11 : Concentration en macrophages en fonction de la CCS à l'échelle logarithmique avec la courbe de tendance associée.....	121
Annexe 12 : Concentration en PMN morts en fonction de la CCS à l'échelle logarithmique avec la courbe de tendance associée.....	121
Annexe 13 : Effet de la lignée sur les comptages des différents types de leucocytes.....	122
Annexe 14 : Effet de la date sur les comptages des différents types de leucocytes.....	122
Annexe 15 : Tableau de significativité des différences entre les catégories de la Figure 12.....	123
Annexe 16 : Répartition en pourcentage des isolats selon chaque lignée par rapport à la totalité des échantillons.....	123
Annexe 17 : Comparaison des données obtenues à l'aide des deux méthodes bactériologiques.....	124
Annexe 18 : Tableau de significativité des différences entre les catégories de la Figure 19.....	124
Annexe 19 : Tableau de significativité des différences entre les catégories de la Figure 20.....	125
Annexe 20 : Comptages cellulaires et bactériologiques dans des laits de brebis issues d'une sélection divergente après inoculation de <i>S. aureus</i>	126

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribo-nucléique
AOP : Appellation d'origine protégée
CAEV : Caprine Arthritis Encephalitis Virus
CCS : Concentration des cellules somatiques
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMT : California Mastitis Test
FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting
FcR : Fragment crystallizable Receptor
IFN : Interférons
Ig : Immunoglobuline
IL : InterLeukine
LDH : Lactate déshydrogénase
M-SAA3 : MammarySerum Amyloid A3
NAGase : N-acétyl- β -D-glucosaminidase
NOD : Nucleotide Oligomerization Domain
PAMP Pathogen Associated Molecular Patterns
PMN : Polymorphonucléaires Neutrophiles
PRR : Pattern Recognition Receptor
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
QTL : Quantitative Trait Loci
SCN : Staphylocoque Coagulase Négatif
SCP : Staphylocoque Coagulase Positif
SCS : Somatic Cell Score
SD : Standart Deviation
SE : Standart Error
TB : Taux butyreux
TLR : Tool-Like Receptor
TP : Taux protéique
UFC : Unité Formant Colonie

Introduction

La santé mammaire est un enjeu majeur en élevage laitier, et les élevages caprins, dont la principale production est le lait, ne font pas exception. En effet les infections mammaires, à l'origine d'une inflammation de la glande mammaire appelée mammites, peuvent avoir des conséquences sévères, à cause de la baisse de production et de l'altération de la qualité du lait qu'elles engendrent. Par ailleurs, outre ces pertes de revenu, il faut prendre en compte des frais supplémentaires qui sont engagés pour soigner les animaux atteints et mettre en place des mesures préventives.

Pour cette forme, le problème du dépistage, et éventuellement du traitement précoce se pose. Pour évaluer la santé mammaire d'un troupeau ou bien celle d'un animal isolé, la mesure de la concentration des cellules somatiques (CCS) dans le lait est la méthode la plus commune. C'est une méthode de diagnostic indirecte, peu coûteuse, et facile à réaliser. En effet, la CCS augmente fortement lors d'une infection bactérienne, à cause du recrutement local de leucocytes tels que des neutrophiles, des macrophages et des lymphocytes.

L'héritabilité de la CCS chez la chèvre est bonne, ce qui pourrait en faire un critère de sélection pour améliorer la résistance aux mammites, et ainsi augmenter la qualité du lait et éventuellement limiter le traitement curatif, reposant sur l'utilisation d'antibiotiques, qui est cependant rare chez les petits ruminants par comparaison aux bovins. Cependant, chez la chèvre, la relation entre augmentation des CCS et infection bactérienne est supposée biaisée par de nombreux facteurs non infectieux qui font varier les CCS.

L'objectif de cette étude était donc d'évaluer, à partir de données collectées sur des chèvres appartenant à deux lignées divergentes sur le critère CCS, l'effet des infections bactériennes sur la réponse inflammatoire mammaire, en considérant dans cette analyse, les effets non infectieux. Ce travail expérimental s'inscrit dans le cadre d'un programme plus large, destiné à améliorer le diagnostic, la prévention et la prise en charge des infections mammaires chez les petits ruminants.

Dans une première partie bibliographique, nous présenterons l'importance et la gestion des mammites en filière caprine. L'étiologie et l'épidémiologie de ces affections seront ensuite détaillées. Nous nous attacherons enfin à étudier la physiopathologie des mammites chez la chèvre en insistant sur la réponse inflammatoire mammaire et les facteurs, infectieux ou non, qui la modulent.

Dans une seconde partie, nous présenterons les résultats d'une étude expérimentale réalisée en 2013 sur les chèvres issues d'une sélection divergente sur le critère CCS. Nous nous interrogerons alors sur les différents facteurs, qui influencent la réponse inflammatoire mammaire. Nous nous appuierons pour cela sur des données de dénombrement et d'analyse de la composition cellulaire du lait obtenues par cytométrie en flux, et des données bactériologiques obtenues par isolement en culture ou PCR quantitative.

Chapitre I : Etude bibliographique

1. IMPORTANCE DES MAMMITES EN ELEVAGE CAPRIN LAITIER

Une mammites est définie comme une inflammation de la glande mammaire. Chez les petits ruminants, comme chez la vache, les mammites peuvent prendre différentes formes : elles peuvent être détectables au moment de l'examen clinique, car elles sont responsables de l'apparition de symptômes majeurs, qui peuvent aller jusqu'à l'atteinte générale de l'animal. Elles peuvent être beaucoup plus discrètes et sans signe clinique apparent, et être qualifiées de mammites subcliniques. C'est cette dernière forme qui a les conséquences les plus sérieuses à cause de sa fréquence, et l'impact négatif qu'elle a sur l'économie des élevages caprins laitiers. Elle représente aussi la cause la plus fréquente de réforme volontaire pour raison sanitaire (1–3). Les mammites sont donc particulièrement invalidantes dans l'espèce caprine dont l'objet principal est la production de lait.

1.1. Conséquences économiques

Les mammites caprines ont un impact économique direct via le coût total des traitements qu'elles imposent. En effet, ces traitements sont coûteux comparativement à la valeur de la réforme et la résolution des infections qu'ils permettent. De plus, la majorité des traitements engendre des temps d'attente, durant lesquels le lait ne peut pas être livré. En conséquence, les traitements curatifs sont rarement mis en œuvre dans cette espèce.

Les mammites sont la première cause de réforme dans l'espèce caprine, car une chèvre atteinte de mammites produit significativement moins de lait, passant d'une moyenne de 0,98 kg de lait/traitement (+/- 0.04) pour une chèvre saine à 0,69 kg/traitement (+/-0.04) pour une chèvre infectée, soit une diminution de 30% environ (4). Le lait de chèvre est bien valorisé par rapport au lait de vache avec un prix moyen de 700 euros pour 1 000L en 2016 contre 300 euros/1000L pour le lait de vache. Les conséquences économiques sont donc marquées et moins tolérées que dans d'autres espèces.

De plus, les propriétés du lait d'une chèvre infectée sont différentes de celles du lait d'une chèvre saine. La concentration du lactose est significativement plus basse chez les chèvres infectées, alors que les concentrations de l'albumine et des protéines du lactosérum sont significativement augmentées. Une chèvre saine produit aussi significativement plus de

caillé, car la caséine est partiellement dégradée lors de mammite. Ainsi une chèvre saine donne plus de lait, et sa composition permet un meilleur rendement fromager (4).

Le lait d'une chèvre infectée est significativement plus riche en cellules, ce qui pourrait aussi poser problème pour la transformation en fromage, car les cellules somatiques ont une activité lipasique (5). Cependant, les processus de fabrication des fromages de chèvre, comme l'écémage, la microfiltration et surtout l'affinage, permettent de réduire considérablement l'impact des fortes concentrations de cellules sur les caractéristiques biochimiques et sensorielles des fromages (6), permettant ainsi de minimiser les conséquences de ces altérations sur la transformation du lait de chèvre.

1.2. Aspect sanitaire

En France, la quasi-totalité du lait de chèvre est utilisée pour la transformation fromagère, qu'elle soit réalisée à la ferme (15%) ou par les industries agroalimentaires (85%). Afin de mieux valoriser les produits, la France ne compte pas moins de 14 Appellations d'Origine Protégée (AOP) pour des fromages de chèvre. Or, parmi ces AOP, seuls le Picodon, le Pouligny Saint Pierre et le Saint Maure de Touraine acceptent l'utilisation de lait pasteurisé dans leurs cahiers des charges (7). Pour toutes les autres AOP, la fabrication se fait exclusivement avec du lait cru, ce qui augmente les risques sanitaires. Pour les prévenir, il existe un seuil réglementaire défini par la directive 94/46/CEE sur la présence de *Staphylococcus aureus*, principal agent des mammites cliniques, dans le lait destiné à la production de fromages au lait cru. En effet les germes qui sont responsables des mammites se retrouvent dans le lait et peuvent aussi être néfastes pour le consommateur. L'ingestion de toxines de *S. aureus* est associée à une forme de gastro-entérite qui se manifeste cliniquement une à deux heures après l'ingestion, par des vomissements avec ou sans diarrhée, une douleur abdominale, et éventuellement des tremblements et des maux de tête (8).

A titre d'exemple, en 2014, plusieurs lots de Pélardon, un fromage de chèvre produit au lait cru avec une AOP, ont été rappelés à cause d'une contamination par *E. coli*. Or l'ingestion d'*E. coli* peut entraîner, dans les jours qui suivent la consommation, des gastro-entérites éventuellement hémorragiques, des douleurs abdominales et des vomissements, accompagnés ou non de fièvre, qui peuvent être à l'origine de complications rénales sévères chez l'enfant. Même si ces colibacilles sont exceptionnellement impliqués dans l'apparition

des mammites, cela démontre que la maîtrise de la qualité hygiénique du lait de chèvre est un vrai enjeu sanitaire.

2. GESTION DES MAMMITES EN ELEVAGE CAPRIN

2.1. Prévention des mammites

L'utilisation d'antibiotiques, par voie générale et/ou locale est très souvent requise pour enrayer l'infection bactérienne mammaire. Or dans le contexte actuel, l'utilisation des antibiotiques en élevage doit être réduite, afin de limiter la sélection de germes résistants aux antibiotiques. Réduire l'utilisation des antibiotiques lors d'infections mammaires chez la chèvre est donc aujourd'hui crucial ; cet objectif passe par la réduction de la fréquence de ces infections et donc la prévention des mammites. L'hygiène de la traite et des conditions d'hébergement du troupeau sont des facteurs clés, tout comme le recours à la vaccination ou à la sélection génétique d'animaux plus résistants à ces infections.

2.1.1. Mesures hygiéniques de la traite

La traite est une étape clef dans la transmission des infections mammaires d'une chèvre à l'autre ; les bactéries présentes dans le lait contaminent les équipements de traite et peuvent être échangées entre animaux par ce moyen. Une première mesure pour réduire ce risque, consiste à respecter un ordre de traite. Les chèvres identifiées comme infectées sont traitées en dernier. Cependant, les mammites étant quasi-exclusivement subcliniques chez la chèvre, il est difficile de détecter toutes les chèvres porteuses sans avoir recours à des examens complémentaires. Ainsi les primipares qui sont supposées saines au début de la lactation, peuvent par exemple être traitées les premières. Cette mesure est d'autant plus facile à appliquer que l'allotement des chèvres est souvent réalisé en fonction de la date de mise bas, et les primipares ont tendance à être groupées car la mise à la reproduction se fait au même moment. Une réduction de la fréquence des mammites a été observée dans les élevages ayant mis en place cette mesure (9).

Une méthode permettant de maintenir une hygiène du troupeau optimale est la réforme des chèvres infectées. En éliminant les animaux atteints, il est possible de réduire le portage et l'excrétion bactériens, et ainsi le risque de contamination. Cependant, le problème du caractère subclinique de la mammite et donc de sa détection se pose à nouveau ici, car plus la

réforme est précoce, plus son effet est bénéfique. De plus cette mesure a un coût très marqué car l'élevage des chèvres de renouvellement et donc improductives est coûteux.

Une autre mesure essentielle pour réduire les risques de transmission sont de bonnes pratiques et la maîtrise des règles d'hygiène de la traite. Ces mesures concernent l'hygiène des mains de l'opérateur, celle des trayons et celle de la machine à traire. Concernant les trayons, les opérations de pré- et post trempages, largement préconisées et utilisées chez la vache, sont rarement mises en place en élevage caprin. Elles consistent en une désinfection des trayons avant et après la traite avec un produit iodé, et sont réalisées en série sur l'ensemble des animaux. Le post-trempage permet de réduire les nouvelles infections de 31,8% (10), et évite la contamination des primipares. Ces effets bénéfiques se retrouvent particulièrement en début de lactation. Cependant, ces opérations ont un coût et surtout, elles augmentent le temps de traite (17 min de pré-trempage pour 100 chèvres environ), si elles sont correctement réalisées (11). Pour cette raison, peu d'élevages ont recours à cette pratique.

Concernant l'entretien et l'hygiène de la machine à traire, le nettoyage est à réaliser après chaque traite en respectant le temps de pause et les températures à atteindre en fonction des produits utilisés. Une alternance dans l'utilisation de produits basiques ou acides est à respecter. De plus, la machine doit être révisée tous les ans afin de vérifier les paramètres de réglage et l'usure (12). Certains points sont particulièrement importants à contrôler comme l'état des manchons en caoutchouc, la pulsation et le niveau de vide qui peuvent provoquer des lésions du trayon. La salle de traite doit également être nettoyée après chaque traite pour enlever les matières fécales comme sources potentielles de contamination.

Enfin, un facteur qui augmente la fréquence des mammites est lié à la technique de traite, et en particulier, la surtraite. En effet, dans ce cas, la peau du trayon peut être lésée et les défenses mécaniques de la mamelle sont alors moins efficaces, car l'entrée du canal du trayon peut ne plus être aussi étanche. Le système de dépose automatique des faisceaux trayeurs a fortement contribué à limiter ce phénomène (13).

2.1.2. Hygiène du logement

Chez la chèvre, les mammites sont majoritairement dues à des staphylocoques, pour lesquels les sources d'infections sont essentiellement cutanéomammaires. Il est donc indispensable que la mamelle soit maintenue la plus propre possible. La mamelle peut être contaminée lors de la traite, comme décrit précédemment, mais aussi par des contaminations

environnementales, en particulier fécales. La prévention repose donc sur l'hygiène de l'aire de couchage des chèvres. La première mesure est le respect d'une densité minimale de 2 m² par animal. En effet il a été montré chez la brebis que plus la densité augmente, plus le taux de mammites subcliniques est élevé (14). Cette mesure est indissociable d'un paillage abondant et d'un curage fréquent. De plus, la ventilation permet de maîtriser l'hygrométrie et la régulation de la température ambiante, et ainsi de conserver le rôle absorbant de la litière. Dans les élevages où la surface allouée aux animaux est insuffisante, il est en théorie possible de jouer sur les paramètres relatifs à la ventilation (14).

Un autre facteur qui module la souillure de la mamelle est lié à sa conformation. Plus la mamelle est basse et décrochée, plus grand est le risque de souillures. De plus certaines mamelles n'ont pas une conformation adaptée aux manchons trayeurs, ce qui est à l'origine de lésions cutanées (Figure 1). Or, la conformation de la mamelle est un caractère à la fois très variable et dont l'hérédité est élevée. Il semble que la sélection pour la production laitière ait favorisé des conformations non adaptées aux machines de traite et qui augmente le risque de mammites (15).



Figure 1: Variabilité de la conformation mammaire chez des chèvres de notre étude

2.1.3. Vaccination

Chez les petits ruminants, le développement de vaccins contre les mammites a été plus tardif que dans l'espèce bovine ; cette vaccination cible prioritairement les staphylocoques, qui sont les agents bactériens principaux responsables de mammites dans ces espèces.

La vaccination à l'aide de souches bactériennes inactivées est possible, mais des études ayant évalué l'efficacité des différents protocoles sont en nombre très réduit, en particulier chez la chèvre (1). La vaccination à l'aide d'auto-vaccins offre l'avantage d'utiliser

une souche identique à celle à laquelle l'élevage est confronté. La vaccination utilisant des souches de *S. aureus* et de SCN (*S. epidermidis*, *S. simulans* et *S. saprophyticus*) inactivées a également été décrite (16). Chez la brebis, les résultats semblaient prometteurs avec 7,70% d'animaux infectés par *S. aureus* dans le groupe vacciné contre 30,76% dans le groupe des animaux témoins ; en outre, aucun isolat de SCN n'était recensé chez les brebis vaccinées, alors que le groupe témoin avait 19,23% de prélèvements positifs. La vaccination contre *S. aureus* avec des bactéries inactivées ainsi que des anatoxines alpha et beta a été évaluée chez la brebis. Les animaux vaccinés avaient des taux d'IgG spécifiques significativement plus élevés 184 jours après la vaccination (17).

Depuis 2014, un vaccin permettant « de stimuler l'immunisation active afin de réduire l'incidence des mammites subcliniques dues à *S. aureus* et aux Staphylocoques Coagulase-Négatifs et de réduire la sévérité des signes cliniques dus aux Staphylocoques Coagulase-Négatifs » a obtenu une autorisation de mise sur le marché en France. Il s'agit d'un complexe d'antigènes associé au biofilm et d'une souche de *S. aureus* hautement productrice de ce biofilm. L'administration doit être réalisée 5 semaines avant la date prévue de la mise-bas , puis 3 semaines après la première injection (18). Le manque de recul quant à l'efficacité de cette vaccination reste toutefois important.

2.1.4. Sélection génétique

Depuis longtemps, les éleveurs choisissent les reproducteurs sur des critères liés à la production laitière. Une approche encore très peu utilisée pour réduire l'impact des infections mammaires consisterait à sélectionner les animaux sur leur résistance génétique aux mammites. En effet, améliorer les capacités intrinsèques de l'hôte à résister aux infections mammaires pourrait palier les problèmes d'efficacité des vaccins et limiter l'impact des mammites. Cette stratégie présente l'avantage d'être durable puisque les gains de résistance se transmettent de génération en génération. Afin d'objectiver ce critère de résistance, des études ont utilisé le critère CCS qui est un indicateur fiable et peu coûteux permettant de qualifier le statut sanitaire de la mamelle. De plus ce critère possède une héritabilité égale à 0,2 pour la race Alpine (19), ce qui est relativement élevé par rapport à d'autres critères de sélection.

L'indexation des boucs sur le critère CCS a débuté en 1998 en France (19). En 2014, cette indexation a été officialisée afin d'intégrer la résistance aux mammites dans les objectifs de sélection des caprins laitiers (20). A partir de ces données, l'Unité Expérimentale INRA de

Bourges a mis en place deux lignées divergentes sur le critère CCS. Une lignée a été créée en utilisant des reproducteurs dont l'index CCS était défavorable (associé à des CCS de la descendance élevées), il s'agit de la lignée dite « CCS+ » alors que pour l'autre lignée, l'objectif était de créer des animaux avec des CCS plus basses. Par opposition à la précédente, elle est désignée lignée « CCS- ». Comme dans tous les élevages, la prévalence des mammites subcliniques reste assez élevée à l'Unité Expérimentale INRA de Bourges. Ainsi les deux lignées ont été exposées en continue aux agents communément responsables de mammites. Les premières analyses réalisées sur ces lignées, lors des campagnes 2010 et 2011, ont montré que les CCS des échantillons de lait de la lignée CCS- étaient significativement moins élevées que celles de la lignée CCS+ (moyenne de 546 000 cellules/mL vs 1 384 000 cellules/mL) ; le niveau atteint en fin de lactation par la lignée CCS- était équivalent à celui de la lignée CCS+ en début de lactation (Annexe 1). De plus, l'analyse bactériologique a montré que la proportion d'hémi-mamelles positives était significativement plus élevée dans la lignée CCS+ (46%±3 vs 28%±3). Plus précisément, des dénombrements significativement plus grands de *S. epidermidis* (+85%), *S. aureus* (+75%), *S. xyloso* (+75%) et *S. caprae* (+61%) ont été identifiés dans la lignée CCS+ (Figure 2) (21). Enfin, dans une expérience comparable chez la brebis, 48 heures post-infection par *S. epidermidis* ou *S. aureus*, les laits CCS+ ont un titre bactérien significativement plus élevé que ceux de la lignée CCS-, alors que leur CCS sont similaires. Les brebis CCS- semblent donc éliminer plus vite et efficacement les bactéries lors d'infections mammaires (22).

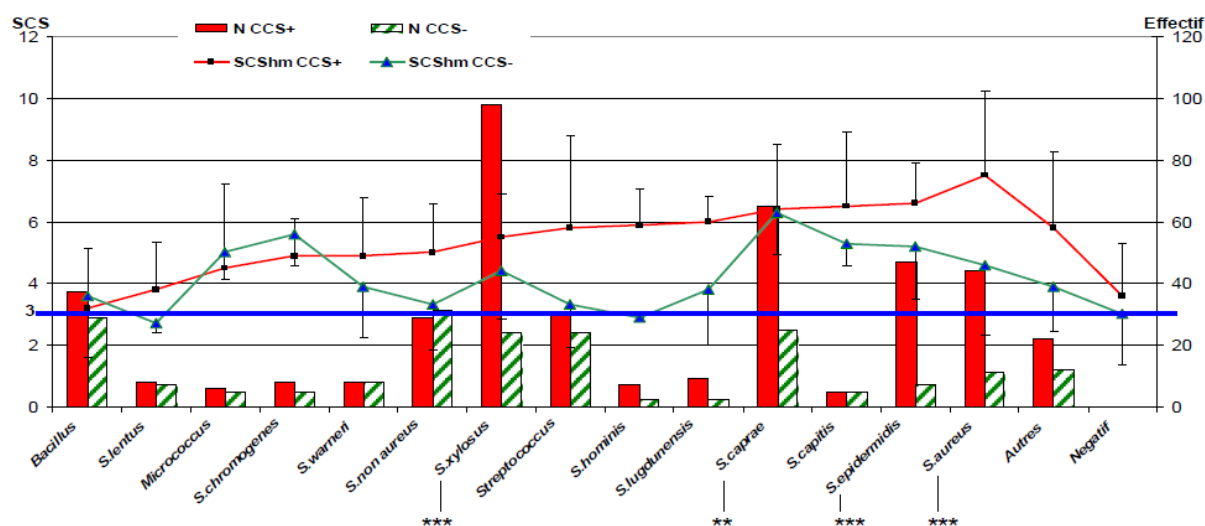


Figure 2 : Nombre de bactéries et SCS hémi-mamelle selon la lignée (***) : P<0,0001, ** : P<0,001 pour l'effectif entre lignées) (21)

Un certain nombre de QTL (*Quantitative Trait Loci*), permettant de déterminer une part non négligeable de la variance génétique des CCS ont par ailleurs été identifiés. Trois régions semblent particulièrement intéressantes chez la chèvre. Elles se situent sur les chromosomes 16, 19 et 21 (23); même si des QTL impliqués dans la résistance aux mammites sont plus ou moins présents sur tous les chromosomes (24). Ainsi l'exploration de ces régions du génome, permettrait d'affiner la sélection, effectuée actuellement sur le phénotype CCS.

Chez la brebis, lors d'infection expérimentale par *S. epidermidis* ou *S. aureus*, 52 gènes au total avaient une expression différente entre la lignée CCS+ et la lignée CCS-. Ces gènes étaient associés à la réponse inflammatoire, à l'adhésion des leucocytes, à la migration cellulaire et à des voies de transduction du signal. En particulier, le gène codant pour le récepteur TLR2 était surexprimé dans les cellules somatiques du lait de la lignée CCS-. Ce récepteur est fortement impliqué dans la détection des bactéries responsables des mammites chez les petits ruminants, ce qui pourrait accroître l'efficacité de la réponse (25). D'autres gènes indiquaient que la diapédèse semblait être plutôt favorisée chez les brebis de la lignée CCS-, même si ce résultat ne se traduit pas par une augmentation des CCS dans le lait de ces brebis à la suite de l'infection (25). La différence entre l'expression génique des cellules dendritiques a aussi été explorée. Il n'existait pas de différence dans l'expression du gène codant pour le récepteur TLR2, mais l'activation de la voie du complément dans les cellules dendritiques était supérieure chez la lignée CCS- (26). Enfin il semble que la différenciation des cellules T régulatrices soit favorisée dans les cellules dendritiques des brebis de la lignée CCS- (26). Concernant le recrutement des neutrophiles, l'interleukine 8 qui a un fort pouvoir d'attraction des neutrophiles, serait plus exprimée dans les cellules épithéliales mammaires des brebis de la lignée CCS+ (22). On ne sait toutefois pas si ces données sont transposables à la chèvre.

2.2. Détection des mammites

La prévention vis-à-vis des mammites n'étant pas absolue, il est important de détecter un animal atteint le plus précocement possible. Plus le délai entre l'infection et le traitement est court, meilleure sera l'efficacité curative. En effet, si le délai est trop long, l'infection peut causer des lésions irréversibles dans le parenchyme mammaire, dans lequel la bactérie se trouve hors d'atteinte des molécules anti-infectieuses. Les mammites caprines ne sont

cependant pas faciles à diagnostiquer, car elles sont en grande majorité subcliniques. Il existe aujourd'hui plusieurs techniques de détection, qu'elles soient indirectes ou directes.

2.2.1. Méthodes indirectes

2.2.1.1. Méthodes basées sur le comptage des cellules somatiques

Une mamelle saine chez la chèvre héberge un petit nombre de cellules immunitaires résidentes. Lorsque l'inflammation mammaire apparaît, quelle que soit son origine, les défenses immunitaires mises en place par l'organisme sont associées à une mobilisation des leucocytes dans le parenchyme mammaire, dont une partie d'entre eux est retrouvée dans le lait ; leur dénombrement permet de suivre indirectement l'état de santé de la mamelle (27). Les cellules somatiques sont constituées de neutrophiles, de macrophages et de lymphocytes, mais aussi de cellules épithéliales, qui en raison d'un renouvellement permanent, desquament et se retrouvent dans le lait.

2.2.1.1.1. California Mastitis Test (CMT)

Cette technique semi-quantitative repose sur une estimation visuelle de la quantité de cellules somatiques dans le lait. Ce test est effectué à l'échelle de chaque hémimamelle, par l'éleveur lui-même, après avoir prélevé les premiers jets de lait, qui sont particulièrement riches en cellules. Il s'agit d'ajouter un volume d'un agent tensioactif, l'alkyl-aryl-sulfonate de sodium (Teepol®) à un volume équivalent de lait. Il lyse les membranes cellulaires, ce qui libère l'ADN cellulaire, qui forme alors un réseau englobant globules gras et micelles de caséine. La viscosité du mélange est proportionnelle à la quantité d'ADN, qui est lui-même proportionnel au nombre de cellules présentes dans l'échantillon (28).

Les résultats sont classés en 5 catégories : « 0 », « Traces », « 1 », « 2 » et « 3 » (Annexe 2). Chez la chèvre, l'interprétation doit être plus souple que chez la vache, car le lait est physiologiquement plus riche en cellules somatiques, notamment en cellules épithéliales. Ainsi en considérant les notes « 0 », « Traces » et « 1 » comme des réactions négatives, la sensibilité est, selon les études, de 47 à 51%, et la spécificité de 73 à 88%, en prenant la bactériologie conventionnelle comme référence (29, 30). Le CMT est donc assez fiable pour exclure une suspicion d'infection intra-mammaire, mais insuffisamment sensible pour dépister les mammites. Il s'agit donc d'un test utile à l'éleveur, par sa rapidité et sa simplicité de réalisation, ainsi que par son coût qui est faible, dans le but de sélectionner des chèvres à

traiter. Il reste cependant subjectif, car assez fortement dépendant de la lecture et de son interprétation par l'opérateur.

2.2.1.1.2. Comptage microscopique par méthode colorimétrique

Il s'agit de la technique de référence proposée par la Fédération Internationale des Laiteries (FIL). Dix microlitres de lait sont étalés sur 1 cm², puis une coloration au bleu de méthylène ou au colorant de Levowitz-Weber est appliquée. Les cellules sont alors comptées dans 100 champs avec un microscope à immersion (31). Cette technique quantitative est donc longue, laborieuse à mettre en œuvre et au-delà d'un maximum de 2 millions de cellules/mL, la lecture devient quasiment impossible (32). De plus, ces colorations teignent indifféremment les cellules et les particules cytoplasmiques, ce qui tend à surestimer les concentrations cellulaires, particulièrement chez la chèvre pour qui, les particules cytoplasmiques représentent une part non négligeable des cellules somatiques du lait en raison du mode apocrine de la sécrétion.

2.2.1.1.3. Comptage électronique des particules (type Coulter Counter)

Cette technique compte le nombre de particules contenues dans le lait grâce à l'émission d'une impulsion électrique, proportionnelle à leur volume, qu'elles déclenchent en passant entre les deux électrodes du compteur. Afin d'éliminer les bactéries du comptage, l'appareil est calibré de façon à ne compter que les éléments dont le diamètre est supérieur à 5µm. Cependant cette limite basse n'élimine pas les globules gras et les particules cytoplasmiques du comptage. Or la sécrétion du lait est apocrine chez la chèvre, contrairement à la vache ou à la brebis (Figure 3). Ceci a pour conséquence la présence physiologique de particules cytoplasmiques dans le lait, qui sont anucléés et ne doivent pas être prises en compte dans l'évaluation de la CCS.

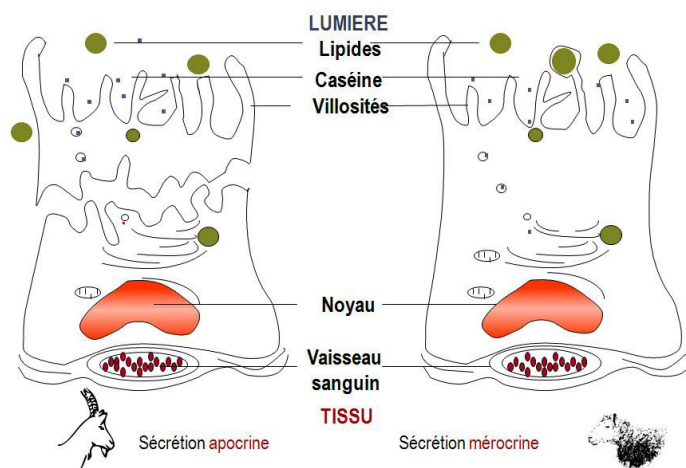


Figure 3 : Comparaison des modes de sécrétion du lait de la chèvre et de la brebis (33)

Ainsi, le détachement d'une fraction de la cellule est à l'origine d'une grande quantité physiologique de débris cellulaires dans le lait (34, 35). Ces particules cytoplasmiques sont anucléées et ne doivent pas être prises en compte dans l'évaluation de la CCS. La CCS du lait de chèvre est donc très largement surévaluée par la technique Coulter Counter, qui bien que facile à mettre en œuvre, n'est plus utilisée depuis plus de 20 ans dans l'espèce caprine (28).

2.2.1.1.4. Comptage par cytométrie en flux (type Fossomatic®)

Contrairement au Coulter Counter, ce type d'automate ne compte que les éléments nucléés grâce à une coloration spécifique de l'ADN au bromure d'éthidium. Les noyaux colorés émettent une fluorescence rouge, convertie en signal électrique, lorsqu'ils sont éclairés par un faisceau lumineux de lumière bleue (400-570 nm). Les bactéries et les éléments anucléés ne sont pas comptés, car l'ADN des bactéries ne renvoie pas un signal fluorescent d'intensité suffisamment forte pour être pris en compte (36). Cette méthode ne permet pas de différencier les types cellulaires, mais elle est particulièrement indiquée pour le lait de chèvre, où il est essentiel ne pas prendre en compte les débris engendrés par la sécrétion apocrine. Les valeurs de la CCS par cette méthode sont ainsi jusqu'à 2 fois plus faibles qu'avec la technique précédente qui compte toutes les cellules nucléées (37).

De plus cette méthode est précise. Une étude, réalisée sur du lait de brebis, a comparé la méthode Fossomatic® avec la microscopie directe et a montré que la corrélation entre les deux méthodes de comptage était comprise entre 97,2 et 99,6%, à condition que les prélèvements soient correctement conservés (38). Le calibrage des appareils garantit une fiabilité des résultats de CCS dans une gamme allant de 0 à 1 800 000 cellules/ml (22). Il semble toutefois être important de calibrer l'appareil avec du lait de chèvre afin que les

valeurs ne soient pas surestimées (39, 40). Le coût d'une mesure est relativement faible (entre 0,5 à 2 € / échantillon) et les CCS sont généralement mesurées dans le cadre du contrôle laitier officiel, ce qui facilite la démarche. De plus elle est rapide, car elle compte plus de 10,000 cellules par seconde, ce qui permet d'avoir une méthode fiable et beaucoup moins laborieuse et subjective que la microscopie (41).

2.2.1.1.5. Cytométrie en flux basée sur la fluorescence

La cytométrie en flux permet de différencier les populations de cellules au sein d'un échantillon. Elle repose sur la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques d'une cellule. Pour cela, les cellules sont amenées au centre de la buse de mesure et alignées les unes derrière les autres au moyen du système de centrage hydrodynamique de l'échantillon (Annexe 3). Elles défilent alors à très grande vitesse dans un flux laminaire, et sont excitées une à une par un faisceau lumineux. Les différents signaux optiques émis par la cellule doivent alors être focalisés, séparés, puis acheminés vers des systèmes de détection, photomultiplicateurs ou photodiodes. Ils sont pour cela, sélectionnés par différents circuits optiques, composés d'une alternance de miroirs et de filtres. Le signal lumineux recueilli frontalement au laser par diffusion à travers la cellule, renseigne sur la taille relative de celle-ci (Forward Scatter = FSC). Le signal lumineux diffracté, recueilli à 90°, renseigne sur la structure intracellulaire et la granularité (Side Scatter = SSC) (Annexe 4). Ainsi, la mise en relation de ces deux informations permet une première séparation des différentes populations de cellules du lait (42) (Figure 4).

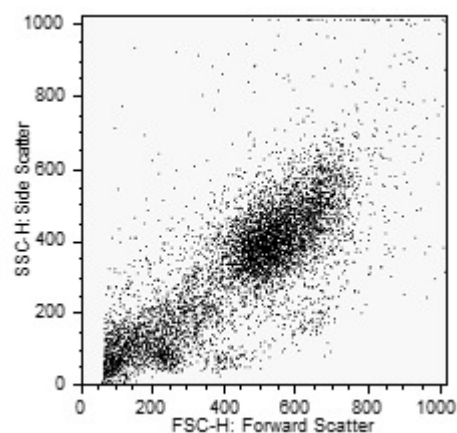


Figure 4 : Répartition des cellules contenues dans le lait d'une chèvre de notre étude en fonction de leurs SSC et de leurs FSC

Cependant, l'identification des cellules du lait seulement basée sur les signaux FSC et SSC, c'est-à-dire la taille et la granularité, est difficile à cause d'une trop grande proximité de leurs caractéristiques dans le lait. De plus, des débris peuvent interférer avec les mesures. Aussi il est nécessaire d'ajouter un ou plusieurs marquages fluorescents avec des anticorps monoclonaux vis-à-vis de marqueurs de surface, ou bien de marquer les acides nucléiques ADN/ARN pour différencier les différents types cellulaires (43–46). Ces données sont donc des informations supplémentaires, sur chaque cellule, ce qui permet de les reconnaître plus spécifiquement, voire de savoir si elles sont vivantes (Figure 5). Il reste tout de même quelques confusions entre certains types cellulaires, particulièrement entre les lymphocytes et les neutrophiles morts en cas d'infection.

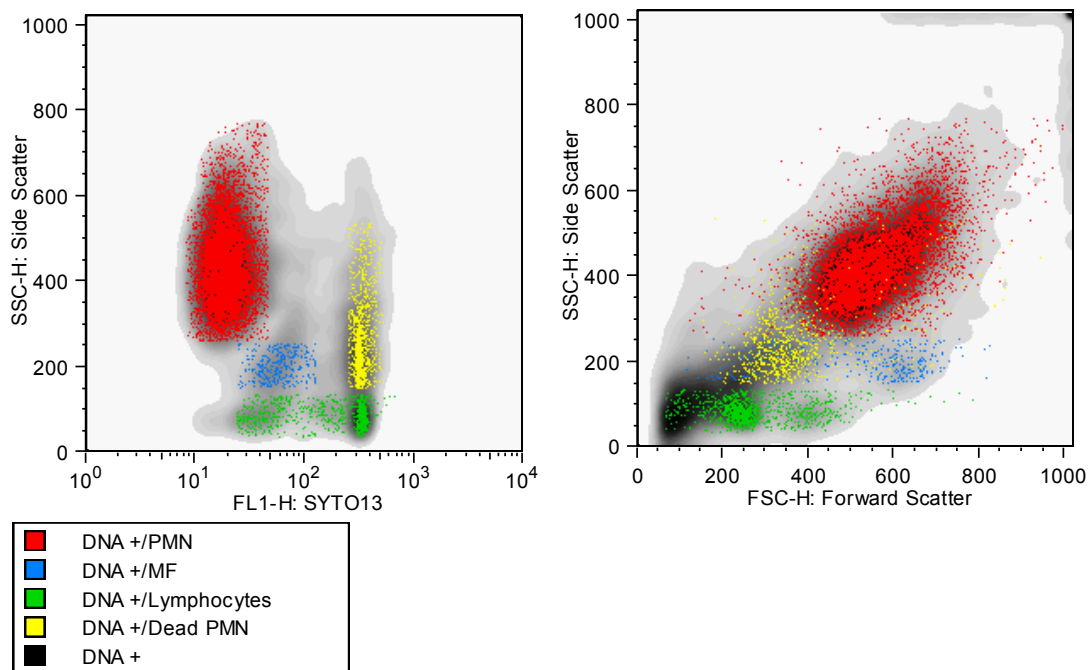


Figure 5 : Données FACS du lait d'une chèvre de notre étude, obtenues après marquage par SYTO 13®

Pour l'espèce bovine, il a été montré que la spécificité de cette méthode était supérieure à la méthode Fossomatic® (83% contre 45%), mais que sa sensibilité était similaire (100% contre 92%) (47). Il est donc intéressant d'évaluer cette approche dans l'espèce caprine, afin de déterminer les critères de diagnostic applicables à cette espèce.

2.2.1.2. Autres méthodes

2.2.1.2.1. Conductivité électrique

La mesure de la conductivité électrique du lait est un test de dépistage très utilisé pour l'espèce bovine, pour laquelle il est quelquefois intégré directement à l'équipement de traite. Au contraire, il est très peu utilisé chez les petits ruminants. La technique repose sur la propriété d'un corps ou d'une substance à transmettre le courant électrique. Ainsi, à une température donnée, tout changement de la nature et/ou de la concentration en ions provoque une modification de la conductivité.

Or, lors d'inflammation mammaire, les concentrations en lactose et en ions potassium dans le lait diminuent, alors que celles du sodium et du chlore augmentent, ce qui entraîne une augmentation de la conductivité électrique du lait. Ces variations sont principalement dues aux dommages cellulaires, notamment au niveau des jonctions serrées des cellules épithéliales, à l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins, ainsi qu'à l'altération du système de pompage ionique (48, 49).

Les publications relatives à l'impact des mammites sur la conductivité électrique du lait restent peu nombreuses et parfois contradictoires pour l'espèce caprine. Le seuil de conductivité du lait le plus fiable pour considérer une chèvre comme infectée a été établi à 5,20 mS/cm (avec une sensibilité de 70% et une spécificité de 50%). Cependant, il existe d'importantes variations de la conductivité du lait liées à des facteurs autres que l'infection mammaire (49). Ainsi le rang de lactation, la race, l'intervalle entre les traites, le stade physiologique, la composition du lait ou encore la température peuvent considérablement faire varier la conductivité du lait (50).

2.2.1.2.2. Méthodes de dosages

Certaines méthodes, plus ou moins utilisées dans l'espèce bovine, ne sont encore utilisées qu'à titre expérimental ou très exceptionnellement dans l'espèce caprine.

Le dosage des protéines de la phase aiguë dans le lait est étudié dans l'espèce bovine, et particulièrement celui de la M-SAA3 qui est un isomère de la Sérum Amyloïde A. Une corrélation significative entre les concentrations en M-SAA3 du lait et les CCS a été montrée, bien que la spécificité de cette méthode ne soit pas optimale, car l'augmentation de cette

protéine est présente quel que soit le type d'inflammation (51, 52). L'alphatrypsine est une autre protéine dont la concentration dans le lait augmente conjointement à celle de la perméabilité vasculaire lors d'inflammation. Cependant, son augmentation n'est significative que lors de mammite clinique, ce qui en fait un mauvais marqueur chez la chèvre, puisque les mammites sont principalement subcliniques (53). La lactoferrine est quant à elle une glycoprotéine synthétisée dans la glande mammaire, qui présente des propriétés antibactériennes. Elle est significativement plus présente dans les laits des vaches infectées (54), et semble permettre une meilleure distinction entre mamelle infectée et non infectée comparativement aux CCS et à la N-acétyl- β -D-glucosaminidase (55–57). Cependant, le stade de lactation et la parité affectent de manière significative la concentration en lactoferrine dans le lait, et trop peu d'études ont été réalisées pour l'utiliser comme méthode de diagnostic actuellement (56).

La détermination de l'activité de certaines enzymes dans le lait peut aussi être explorée. Certaines enzymes témoignent de la lyse cellulaire lors d'un processus inflammatoire. La N-acétyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) est une enzyme cytoplasmique produite par les cellules épithéliales et les neutrophiles durant la phagocytose ; elle est libérée lors de la lyse de ces cellules (58). Plusieurs études réalisées chez la chèvre ont montré que l'augmentation de son activité était corrélée au rang de lactation ; mais surtout à la présence d'une inflammation mammaire, particulièrement lorsqu'elle était due à un agent pathogène majeur (53, 57, 59). La NAGase semble donc un marqueur prometteur de l'infection mammaire chez la chèvre. La β -Glucuronidase, produite par les phagocytes, est considérée comme un paramètre très sensible et très efficace pour le dépistage des mammites subcliniques chez la vache (60, 61). La Lactate Déshydrogénase (LDH), contenue dans les cellules sanguines, est utilisée en routine et en ligne dans l'espèce bovine. En effet, son activité dans le lait augmente lors d'inflammation, car la perméabilité vasculaire est augmentée, et de nombreux leucocytes présents dans le tissu mammaire sont lysés. Ainsi plusieurs études montrent un lien significatif entre une augmentation de l'activité de cette enzyme dans le lait et la présence d'une mammite subclinique chez la chèvre (62, 63). La lactoperoxydase, synthétisée essentiellement par les neutrophiles, a une activité dont l'augmentation semble significativement corrélée à celle des CCS chez la chèvre (64). Cependant, concernant les trois dernières enzymes, trop peu d'études sont disponibles pour l'espèce caprine, et il est impossible de conclure quant à leur fiabilité et leur intérêt pour la détection des mammites.

Les méthodes indirectes de détection des mammites chez les ruminants sont donc nombreuses. Chez la chèvre, les plus communément utilisées, - celles pour lesquelles les études sont les plus nombreuses -, sont la détermination des CCS et le CMT. Ces méthodes de dépistage sont cependant fortement influencées par des facteurs non infectieux qui peuvent biaiser les résultats. Une approche pourrait donc être la combinaison de plusieurs tests de dépistage, tels que les CCS, la lactoferrine et la NAGase, tout en prenant en compte les facteurs de variation non infectieux majeurs comme le stade de lactation et la parité (28).

2.2.2. Bactériologie du lait

Le diagnostic des infections mammaires à l'aide de la bactériologie est considéré comme étant la meilleure mesure de détection des mammites, s'il est réalisé régulièrement et sur toutes les mamelles (65). Il permet d'identifier les mammites cliniques, les mammites subcliniques mais aussi de connaître l'agent pathogène impliqué, grâce à quoi, le vétérinaire peut mettre en place le traitement et les mesures de gestion les plus adaptés. Son coût reste toutefois supérieur au comptage cellulaire ; c'est pourquoi il n'est pas utilisé en routine, outre des contraintes de mise en œuvre. De plus, il faut être très vigilant lors du prélèvement qui doit être réalisé dans les meilleures conditions d'asepsie possible, afin d'éviter une contamination extérieure des échantillons de lait.

2.2.2.1. Méthode conventionnelle

Il s'agit de la technique de référence (59), dont le protocole a été établi par le National Mastitis Council (66). Elle permet d'identifier l'espèce bactérienne mais aussi d'avoir une estimation de la quantité de bactéries présente dans l'échantillon. Pour cela, une fraction de l'échantillon est étalée sur un milieu où les bactéries sont susceptibles de se développer et de se multiplier pour former des colonies ; le plus souvent, il s'agit d'une gélose au sang de mouton. Le nombre d'Unités Formant Colonies (UFC) visibles sur la gélose peut alors être déterminé. Cependant, on ne peut compter que 200 colonies au maximum sur une boîte de Pétri, car au-delà les colonies sont trop proches les unes des autres pour être dénombrées. Cette méthode ne permet pas d'isoler les mycoplasmes, pour lesquels la méthode à utiliser est plus complexe et la culture plus longue.

Cependant, chaque bactérie présente dans l'échantillon ne va pas systématiquement se multiplier pour donner une colonie ; certaines vont mourir ou ne se multiplieront pas

suffisamment pour être visible. En effet, une inhibition de la croissance peut être causée par une diminution du pH due à la fermentation de la flore contaminante (67). D'autres facteurs peuvent plus couramment être à l'origine de résultats faussement négatifs, tels qu'une antibiothérapie, une infection à germes intracellulaires, une excrétion intermittente et/ou en faible quantité d'un autre agent pathogène, une interaction avec les enzymes du lait ou une méthode bactériologique inadaptée. Ainsi le dénombrement est souvent largement sous-estimé.

A partir d'une colonie, il est également possible d'identifier l'espèce bactérienne grâce à des galeries constituées d'une série de tests biochimiques. En testant le type de colonie majoritaire sur la gélose, on peut ainsi déterminer l'espèce dominante dans l'échantillon.

Le risque d'un résultat faussement positif à la suite d'une contamination de l'échantillon doit aussi être considéré. Ainsi, certaines études ont proposé l'isolement de l'agent pathogène dans deux échantillons de lait consécutifs au minimum et espacés d'au moins 24 heures (68) ou l'association de la bactériologie conventionnelle à une numération cellulaire (69) pour considérer que l'infection est effectivement présente et réduire le risque de faux positifs. De plus, le délai pour l'obtention des résultats est long à cause du temps d'incubation nécessaire à la croissance des colonies sur la gélose qui est d'au moins 24-48 heures.

2.2.2.2. Méthode moléculaire par PCR quantitative

La bactériologie moléculaire repose sur des techniques de Polymerase Chain Reaction (PCR) et permet de donner une information quantitative sur la présence de bactéries, dont les mycoplasmes, dans l'échantillon. La technique de PCR quantitative (qPCR) repose sur l'amplification par polymérisation de l'ADN spécifique à une bactérie ou à une famille de bactéries. Avant d'utiliser la PCR, l'ADN doit être extrait à partir de l'échantillon de lait car celui-ci possède des substances pouvant inhiber la réaction de polymérisation (70). Cet ADN est placé dans un thermo cycleur où il va être amplifié. La multiplication des séquences cible d'ADN est exponentielle, car les séquences d'ADN dupliquées, appelées amplicons, au cours d'un cycle servent de base de duplication aux cycles suivants. Durant cette phase de duplication un marqueur chimique fluorescent se fixe aux amplicons. La fluorescence mesurée à la fin de chaque cycle est proportionnelle à la quantité d'amplicons générés. L'analyse de l'amplification consiste à déterminer après combien de cycles, le signal est

significativement supérieur à un seuil fixé de façon arbitraire ; ce cycle nommé Ct pour cycle threshold est celui où la fluorescence est statistiquement et significativement plus élevée que le bruit de fond (71) (Figure 6). Plus un échantillon est initialement riche en ADN cible, moins le nombre de cycles nécessaire pour atteindre ce seuil est grand, donc plus le Ct sera faible. La valeur du Ct peut donc être traduite en un résultat quantitatif en comparant les valeurs de Ct obtenues avec celles d'une gamme dont la quantité de chaque point a été préalablement déterminée (72).

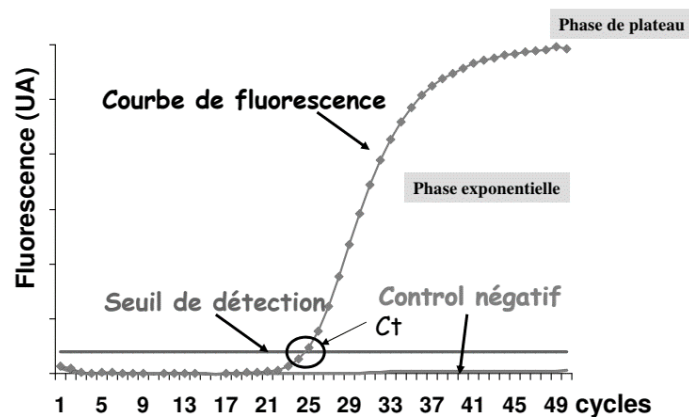


Figure 6 : Exemple de la détermination du Ct en fonction de la fluorescence et du nombre de cycles d'amplification

Il s'agit d'une méthode très sensible, spécifique car basée sur l'identité génétique de l'agent pathogène et qui est rapide. En effet, l'analyse d'un échantillon ne prend que 3 à 4h avec les trousse commerciales (73). De plus cette méthode est pratique, car elle fonctionne aussi à partir d'échantillons ayant été congelés ou si on a eu recours à des agents de préservation (74).

L'inconvénient de cette technique est qu'elle ne permet de détecter qu'un nombre limité de types bactériens. Pour les échantillons de lait de vache, la détection de 11, voire 19 espèces bactériennes simultanément est actuellement possible. Cette trousse semble avoir une meilleure sensibilité que la bactériologie conventionnelle (89% des échantillons positifs contre 77%) mais le risque de faux positifs en raison d'une contamination est très élevé (75). Une étude chez les petits ruminants a donné des résultats similaires entre la bactériologie conventionnelle et cette trousse, dans 98,9 % des échantillons (69). Cela tient probablement à la nature des germes responsables des mammites chez les espèces de petits ruminants qui sont majoritairement des stahylocoques ou des streptocoques et plus rarement des pasteurelles. Enfin, pour palier au risque élevé de faux positifs, dû à la très grande sensibilité de cette

technique, il est particulièrement important d'éviter toute contamination extérieure au moment du prélèvement et de la manipulation des échantillons (69, 76).

3. EPIDEMIOLOGIE DES MAMMITES CHEZ LA CHEVRE

3.1. Prévalence des infections intra-mammaires et des germes isolés

3.1.1. Prévalence des mammites cliniques et les germes responsables

Dans l'espèce caprine, les mammites cliniques sont habituellement sporadiques ; leur prévalence globale n'excède généralement pas 5% dans un troupeau considéré comme sain (77, 78). La majorité des mammites cliniques sont dues à des staphylocoques exprimant la coagulase, dits coagulase-positifs (SCP), et en particulier à *S. aureus* dans 30 à 80% des cas de mammites en fonction des études publiées (1, 78–81).

Dans moins d'un pourcent des élevages, des épisodes épizootiques ou enzootiques dus à *S. aureus*, et plus rarement à *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus*, *S. uberis*, *S. suis* sont possibles. Dans ce cas la morbidité peut alors dépasser 50% de l'effectif total (77).

Contrairement à l'espèce bovine, la prédisposition aux mammites cliniques n'est pas plus forte en peripartum dans l'espèce caprine. L'incidence est maximale après 2 à 3 mois de lactation. Les mammites cliniques dues aux staphylocoques ou aux streptocoques persistent alors souvent pendant longtemps dans la mamelle sous une forme subclinique (1, 77, 82, 83).

3.1.2. Prévalence des mammites subcliniques et des germes associés

Les études divergent à propos de la prévalence des agents pathogènes associés aux infections mammaires chez la chèvre (Annexe 5). En effet, les conditions d'élevage, la saison, la race, les techniques de prélèvement et d'analyse influencent grandement les résultats obtenus. Cependant la majorité des études converge pour classer les staphylocoques comme les agents infectieux principaux, avec une prévalence pouvant aller jusqu'à 97,6% (82). Lors d'infections subcliniques, les Staphylocoques Coagulase Négatifs (SCN) sont les premiers incriminés, avec une incidence moyenne de 61,1% (SD =23,3) dans les études. Viennent ensuite les SCP avec une prévalence moyenne de 18,6% (SD =16,3), qui est beaucoup plus faible que celle des SCN, mais aussi très variable d'une étude à l'autre. Contrairement à

l'espèce bovine, la prévalence des infections dues à des bactéries à Gram négatif, des streptocoques et des mycoplasmes est faible mais assez fluctuante selon les études. Enfin on remarquera que dans quelques études récentes, la prévalence de Corynébactéries est très élevée, allant de 31,5% à 57,6% (83–85).

3.2. Présentation des bactéries responsables des mammites caprines

3.2.1. Les Staphylocoques

Ce sont des coques à Gram positif, commensales de la peau et des muqueuses de l'animal et de l'homme. On peut les diviser en deux sous-groupes différenciés par la présence ou l'absence de l'activité coagulase.

3.2.1.1. Les Staphylocoques Coagulase Positifs (SCP)

Dans l'espèce bovine, une étude sur 177 échantillons de lait contenant un SCP a montré que 97% des isolats étaient identifiés comme *Staphylococcus aureus*, 2% comme *Staphylococcus intermedius* et 1% comme *Staphylococcus hyicus* (86). Dans le cas des mammites caprines, l'espèce *aureus* domine que ce soit par sa prévalence ou son importance clinique. Elle peut provoquer des mammites chroniques, aiguës, ou gangreneuses dans les cas les plus sévères. *S. aureus* possède de nombreux facteurs de virulence. La sécrétion d'exopolysaccharides forme une barrière protectrice lui permettant de mieux échapper à la réponse immunitaire, et même à certains traitements antibiotiques. De plus, *S. aureus* produit de nombreuses toxines, responsables d'importantes lésions cellulaires et tissulaires : les hémolysines alpha, beta et delta qui sont détectées avec une forte prévalence chez la chèvre (80), les leucotoxines qui sont sécrétées en quantité plus grande chez les petits ruminants que chez la vache (87), et les entérotoxines, thermostables et responsables de rares cas d'intoxication alimentaire chez l'homme (88). D'autres SCP sont plus rarement isolés chez les chèvres. Il s'agit de *S. hyicus* et *S. intermedius* (89–92). Ils sont principalement responsables de mammites cliniques (93). La prévalence de *S. hyicus* peut être assez élevée dans les élevages où il est isolé, atteignant 9% à plus de 14% des échantillons positifs (89, 90), alors que celle de *S. intermedius* reste faible, avec moins de 4%, dans les études publiées où il a été isolé (90, 91).

3.2.1.2. Les Staphylocoques Coagulase Négatifs (SCN)

Ce sont les principaux agents des mammites subcliniques chez la chèvre

Tableau I : Distribution des principales espèces de SCN isolées dans les études publiées

Auteur	De Cremona (82)	Deinhofer et Perntner (94)	Conteras et al. (89)	Conteras et al. (95)	Mercier et al. (91)	Baudry et al. (10)	Leitner et al. (59)	Da Silva et al. (80)	Moroni et al. (96)	Leitner et al. (97)	Aulrich et Barth (98)	Koop et al. (83)	Marogna et al. (90)
Pays	France	Autr.	Esp.	Esp.	France	France	Israël	Brésil	Italie	Israël	All.	Pays-Bas	Italie
Année	1995	1995	1995	1997	1998	2000	2004	2005	2005	2007	2008	2012	2012
Cp	144	204	188	131	230	222	500	223	305	377	-	530	1388
E	8	3	10	4	5	1	10	29	5	3	1	5	31
Ech Tot	5905	2243	369	1834	457	2220	1000	-	4571	754	342	2854	-
% IIM SCN	95,2	74,6	66,7	76,2	79,9	87,3	85,0	-	80,2	60,2	-	30,8	54,9
<i>S. caprae</i>	24,6	20,0	25,0	11,7	21,7	36,9	43,7	8,5	15,7	18,5	2,0	34,7	27,0
<i>S. epidermidis</i>	32,8	39,2	22,7	5,0	34,1	5,3	24,9	-	38,9	32,6	60,8	20,1	34,9
<i>S. chromogenes</i>	2,29	1,6	13,6	25,0	13,7	14,9	10,7	5,8	17,8	18,5	-	4,4	4,7
<i>S. simulans</i>	21,12	10,8	-	5,8	5,8	7,4	17,3	4,0	9,6	30,4	17,6	15,7	7,9
<i>S. xylosus</i>	5,09	2,0	6,8	25,8	4,9	9,2	3,4	3,6	2,1	-	19,6	12,8	3,9
<i>S. warneri</i>	-	0,8	2,3	8,3	1,3	4,6	-	6,3	14,0	-	-	0,9	2,6
<i>S. capitis</i>	-	3,2	9,1	10,0	1,3	8,9	-	28,6	-	-	-	0,9	-
<i>S. hominis</i>	7,89	1,6	2,3	2,5	2,2	-	-	-	-	-	-	-	1,2
<i>S. lentus</i>	0,25	15,6	-	4,2	2,7	9,2	-	-	-	-	-	0,6	0,6
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	4,5	0,8	0,4	-	-	-	-	-	-	4,4	-
<i>S. sciuri</i>	-	0,8	-	0,8	0,4	-	-	2,2	-	-	-	-	0,6
<i>S. arletae</i>	-	1,2	2,3	-	-	3,5	-	-	-	-	-	1,2	-
<i>S. lugdunensis</i>	5,09	2,8	-	-	6,6	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	-	0,4	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. cohnii</i>	0,76	-	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-
<i>S. intermedius</i>	-	-	-	-	3,5	-	-	-	-	-	-	-	2,0

<i>S. kloosi</i>	-	-	-	-	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. croceolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	-
<i>S. auricularis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-
<i>S. gallinarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-

Cp : nombre de chèvres ; *E* : nombre d'élevage ; *Ech Tot* : nombre d'échantillons prélevés ; *Ech pos SCN* : nombre d'échantillons positifs en SCN ; % IIM SCN : pourcentage d'IIM dues à des SCN ; *SCN id.* : nombre d'échantillons où l'espèce de SCN a été identifiée ; % *SCN id.* : pourcentage de SCN identifiés.

All. : Allemagne, Esp. Espagne, Autr. Autriche

Le pouvoir pathogène des SCN est en partie lié à des hémolysines produites par 60 à 80% des souches (1, 80). Il est très variable d'une souche à l'autre, et provoque majoritairement des infections subcliniques chez la chèvre. D'après les études répertoriées dans le Tableau I, les principales espèces mises en jeu sont *S. caprae*, et *S. epidermidis*, représentant souvent à eux deux la moitié des SCN identifiés. Viennent ensuite : *S. simulans*, *S. chromogenes* et *S. xylosus*. Les prévalences sont toutefois extrêmement variables d'une étude à l'autre et même entre deux élevages d'une même région et d'une même étude (96).

3.2.2. Les autres bactéries

3.2.2.1. **Les Streptocoques**

Ce sont des coques à Gram positif qui font partie des agents pathogènes majeurs des mammites caprines, c'est-à-dire qu'ils provoquent essentiellement des mammites cliniques. Contrairement à l'espèce bovine, leur prévalence est faible dans l'espèce caprine. Leur présence souligne en général un problème environnemental, particulièrement dans les élevages où la litière est souillée. Les streptocoques les plus fréquemment rencontrés sont *S. uberis* et *S. suis*, alors que *S. agalactiae* et *S. dysgalactiae* ne sont que rarement isolés chez la chèvre (99).

3.2.2.2. **Les Corynébactéries**

Ce sont des bacilles à Gram positif, qui peuvent causer des mammites caprines subcliniques, dont la prévalence est généralement faible. Dans des études récentes leur prévalence est cependant plus élevée dans quelques troupeaux, et une relation entre production laitière élevée et infection par *Corynebacterium bovis* a été mise en évidence (83).

3.2.2.3. Les Entérobactéries

Il s'agit de bacilles à Gram négatif. *E. coli* est le principal agent incriminé au sein de cette famille d'agents pathogènes majeurs, provoquant donc majoritairement des mammites cliniques. Leur prévalence reste toutefois faible dans l'espèce caprine à cause notamment de la conformation du trayon, dont le canal est plus étroit et donc défavorable à la contamination ascendante et à des fèces plus sèches que chez les bovins. D'autres espèces telles que *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* et *Serratia marcescens* sont rarement isolées (79, 89).

3.2.2.4. Les autres bactéries à Gram négatif

Pseudomonas aeruginosa est le second agent à Gram négatif impliqué dans les mammites caprines après *E. coli*. Il est psychrotrophe et responsable à la fois de mammites cliniques et subcliniques (95). Dans certaines études, on peut aussi retrouver *Mannheimia haemolytica* (89).

3.2.2.5. Les mycoplasmes

Contrairement à la brebis où seul *M. agalactiae* est responsable de mammites, trois autres espèces sont aussi mises en cause chez la chèvre, avec toutefois une importance moindre. Il s'agit de *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* et *M. putrefaciens* (100, 101).

Les mycoplasmes sont responsables d'infections chroniques assez peu symptomatiques. Cependant lors de flambées épizootiques, ils peuvent provoquer une diminution brutale de la production de lait, et une importante modification de sa composition, engendrant des pertes financières très importantes pour l'éleveur (100).

Contrairement aux autres mammites caprines provoquées par les autres bactéries, qui sont quasi-exclusivement transmises par voie ascendante, les mycoplasmoses sont des maladies systémiques. Elles peuvent donc provoquer des mammites bilatérales, qui sont souvent associées à des arthrites et des conjonctivites (101).

3.3. Le Virus de l'Arthrite-Encéphalite Caprine (CAEV)

Le CAEV est un lentivirus dont l'ADN proviral est intégré à l'ADN des monocytes. Les animaux infectés le sont à vie et la prévalence à l'échelle des troupeaux serait de près de 50% (102). Chez l'adulte, le tableau clinique comprend principalement une mamelle indurée avec diminution de la production laitière, des arthrites et des troubles pulmonaires.

L'infection par le CAEV induit une augmentation du nombre de cellules dans le lait des chèvres indemnes de mammite bactérienne, qui peut donc être confondue avec une mammite bactérienne (103, 104). De plus, certains auteurs ont identifié le CAEV comme un facteur favorisant les mammites bactériennes (105), alors que d'autres ont montré qu'il n'y avait pas d'impact de cette infection (106). Enfin, l'augmentation de la CCS, lors d'une infection intramammaire bactérienne serait très significative chez les chèvres séronégatives ($p < 0.01$), alors que ce n serait pas le cas chez les chèvres séropositives (103).

4. PHYSIOPATHOLOGIE DES MAMMITES CAPRINES

4.1. Les défenses vis-à-vis des infections mammaires

Pour la prévention des infections bactériennes, deux types de défense sont présentes dans la mamelle. Les défenses non immunitaires permettent de prévenir l'entrée du germe dans la mamelle. Si celles-ci sont dépassées, les défenses immunitaires entrent en jeu afin d'éviter la multiplication de l'agent pathogène et de l'éliminer.

4.1.1. Défenses anatomiques

Les protections non immunitaires de la mamelle sont très efficaces. Pour comprendre leur rôle, il faut revenir à l'anatomie de la mamelle (Figure 7).

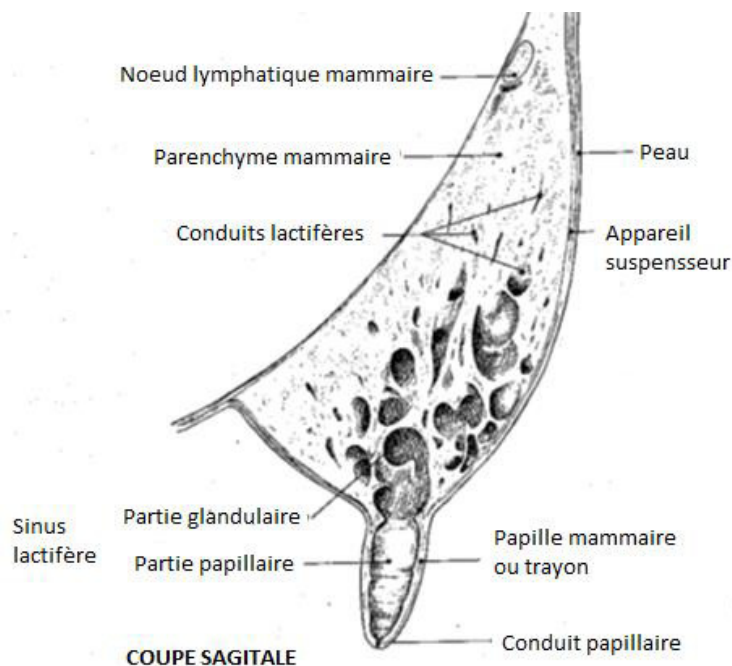


Figure 7 : Coupe sagittale de la glande mammaire de la chèvre (107)

La mamelle est soutenue par un tissu conjonctivo-élastique latéral lui permettant de rester verticale et relativement haute, ce qui évite le contact avec le sol et les souillures. Elle est constituée de deux hémimamelles indépendantes, séparées médialement par un septum conjonctivo-élastique formé par le ligament suspenseur médian. Cette séparation limite le passage d'infections d'une hémimamelle à l'autre. Chaque hémimamelle contient un parenchyme mammaire composé d'alvéoles sécrétrices. Le lait est expulsé grâce à des myo-épithéliocytes étoilés et il est conduit à partir des alvéoles jusqu'au sinus lactifère par l'intermédiaire de 12 à 15 canaux lactifères (107). Cette expulsion du lait vers l'extérieur joue un rôle de protection mécanique de la mamelle en expulsant aussi une partie des germes pathogènes qui ont colonisé la citerne du trayon.

La majorité des infections reste ascendante et parvient à la mamelle via l'apex du trayon, où se situe le conduit papillaire entouré d'un sphincter, qui joue un rôle majeur de défense contre l'entrée des germes. Le conduit papillaire est formé de plusieurs plis longitudinaux recouverts de kératine, qui par sa structure empêche la migration des bactéries vers les structures plus profondes, le dépôt de kératine ayant un effet bactériostatique via les acides gras spécifiques qu'il contient (108). Ces acides gras, dont les acides linoléique, laurique, myristique et palmitoléique, varient en composition et en quantité selon la période, lactation ou période sèche (109). Ils se lient de façon électrostatique aux germes et les rendent plus sensibles aux variations osmotiques, et ainsi à la lyse (110). Les plis du conduit papillaire s'épaississent ensuite et aboutissent à la formation de la rosette de Fürstenberg au niveau de la jonction entre le conduit papillaire et le sinus lactifère ; elle héberge de nombreux leucocytes (107, 110). Le conduit papillaire s'ouvre jusqu'à 2 mm de diamètre lors de la traite, permettant au lait et aux éventuels germes de s'évacuer. Puis les muscles lisses du sphincter et le réseau de fibres élastiques qui l'entourent vont contrôler sa fermeture en plus ou moins 2 heures, évitant ainsi l'entrée des germes entre deux traites. En dehors de la lactation, le trayon est complètement étanche grâce à un bouchon de kératine qui se forme à l'extrémité apicale au bout d'une semaine environ chez la vache laitière (110, 111). Enfin le trayon est recouvert d'une peau très fine, glabre, dépourvue de poils, de glandes sudoripares, sébacées ou muqueuses, ce qui en fait un point critique d'entrée des germes surtout en cas de lésion au cours de la traite (107).

4.1.2. Défenses immunitaires

Dans la mamelle saine, des leucocytes résidents assurent la surveillance immunitaire et permettent d'enrailler très précocement une infection débutante (112). En cas de mammite, le nombre de cellules somatiques augmente dans le lait de chèvre. Cette hausse de la numération cellulaire est due majoritairement à la mise en place de la réponse immunitaire. La réponse non spécifique dans un premier temps est rapide et indispensable en cas de nouvelle infection et se traduit par une activation des macrophages et un recrutement massif de neutrophiles. La réponse spécifique dans un second temps est plus longue à se mettre en place, mais est plus active avec l'intervention des lymphocytes effecteurs mais aussi mémoires. La mémoire immunitaire n'est toutefois pas particulièrement développée au niveau de la mamelle. La réponse immunitaire est initiée dès la détection des germes à l'entrée du trayon via de nombreuses cellules porteuses de récepteurs aux agents microbiens, les Pattern Recognition Receptor (PRR), telles que les macrophages, les cellules épithéliales ou les neutrophiles. Les PRR sont des récepteurs de l'immunité innée, membranaires ou cytoplasmiques, qui reconnaissent des motifs moléculaires caractéristiques des microbes, appelés MAMP (Microbial Associated Molecular Patterns). Au niveau de la mamelle, deux familles de PRR sont particulièrement importants et bien décrits : les Toll-like receptors et les NOD-like receptors (113). Une fois le complexe PRR-PAMP formé, des gènes de défense vont être activés, ce qui va mobiliser des mécanismes cellulaires et humoraux (114).

4.1.2.1. *La réponse humorale*

La réponse humorale est assurée par des composants bactériostatiques non spécifiques agissant indépendamment ou de concert avec les anticorps et les facteurs cellulaires. Il s'agit de la lactoferrine, du lysozyme, du complexe lactoperoxydase/thiocyanate/ peroxyde d'hydrogène et du système du complément (Annexe 6). Cependant ces mécanismes de défense sont sous-représentés dans la mamelle et semblent avoir une importance moindre dans la réponse immunitaire. On peut toutefois noter une particularité du système du complément dans la mamelle où la voie classique est quasi-inexistante. En effet on y trouve extrêmement peu de C1q, précurseur de la voie classique par rapport au C3, qui est le précurseur de la voie alterne (115). Une hypothèse réside dans le fait que le C1q est le plus gros composant du système du complément (900 kDa) et ainsi la transsudation est plus difficile.

4.1.2.2. La réponse cellulaire

Pour lutter contre les infections intra-mammaires, une réponse cellulaire dont la composition est comparable aux exsudats inflammatoires des autres tissus doit être mise en place rapidement. La difficulté réside ici dans la dilution des cellules inflammatoires par les composants du lait, acides gras et protéines, qui gênent le contact et donc la reconnaissance des germes, mais aussi occupent les cellules phagocytaires inutilement, ce qui réduit leur efficacité. Cela nécessite un plus fort recrutement de cellules immunitaires (116).

4.1.2.2.1. Les macrophages

Les macrophages sont issus de la différenciation des monocytes qui est concomitante de leur passage dans les tissus. On les retrouve dans la mamelle, qu'elle soit saine ou infectée, mais en proportion bien moindre chez les caprins que dans l'espèce bovine ou ovine (117). Ils facilitent à la fois la réponse immunitaire innée et acquise, et sont activés par les bactéries, car ils possèdent une grande diversité de récepteurs membranaires (118).

Ils peuvent ainsi phagocyter une grande variété d'organismes et les dégrader après fusion des vésicules de phagocytose avec des granules contenant diverses enzymes dont le lysozyme. Ils détruisent aussi les cellules mortes, dont les neutrophiles usagés évitant ainsi leur dégranulation au niveau des tissus, qui pourrait causer de graves dommages (119). Ils phagocytent aussi les corps apoptotiques ou inertes, tels que des composants du lait, lors de l'involution du tissu mammaire (120, 121).

Suite à leur activation par la phagocytose d'agents pathogènes, ils libèrent des facteurs à activité chimiotactique tels que les prostaglandines, les leucotriènes, le facteur d'activation plaquettaire ou encore des cytokines. Ces facteurs augmentent fortement la réponse inflammatoire locale et, avec des composants du complément, vont attirer les leucocytes au site inflammatoire. Dans le cas de la mamelle, les neutrophiles sont particulièrement concernés (115, 122–125).

Enfin ils participent à l'induction de la réponse immunitaire spécifique localement via la présentation d'antigènes aux lymphocytes par le biais des molécules du CMH (118, 126, 127). Cependant les macrophages mammaires semblent moins efficaces que les monocytes du sang, car cette induction est moindre, tout comme leur pouvoir de phagocytose (112, 126). En retour les lymphocytes T auxiliaires de type I activent quant à eux la phagocytose par les macrophages via l'interféron gamma.

4.1.2.2.2. Les neutrophiles

D'après les références publiées, la population leucocytaire la plus abondante dans la mamelle et le lait d'une chèvre saine est celle des neutrophiles, contrairement à l'espèce bovine et ovine où les macrophages et les lymphocytes sont majoritaires (117, 128). Le lent afflux basal de neutrophiles augmente très significativement lors d'une infection de la mamelle grâce à de puissants facteurs chimiotactiques, les composants du complément C5a et C3a, le leucotriène LTB₄, et des cytokines comme l'IL-1, IL-2 et IL-8, constituant un gradient chimiotactique (122, 129). Ainsi les neutrophiles migrent du sang vers le site inflammatoire par diapédèse facilitée par leur noyau plurilobé, leur permettant de se glisser entre les cellules épithéliales (119, 130). Cette diapédèse est relativement rapide mais dépend du germe incriminé. Ainsi, lors d'une infection par *E. coli* chez la vache, il faut 2 à 12 heures aux neutrophiles pour arriver sur le site de l'infection (125, 131), alors que pour une mammite à *S. aureus*, le recrutement peut être différé de 24 à 48 heures (22). Les neutrophiles agissent alors comme des cellules phagocytaires pendant 1 à 2 jours maximum au niveau du site de l'infection, avant leur apoptose et la phagocytose par les macrophages.

La reconnaissance de l'agent pathogène se fait entre autres par les récepteurs CR1 et CR3, en association avec le système du complément ; les FcR fixant les immunoglobulines IgG2 et IgM, ou encore des récepteurs aux lectines, ou aux glycoprotéines (129). Trois mécanismes principaux sont ensuite responsables de l'action bactéricide des neutrophiles. Le premier est oxygène-dépendant et permet aux neutrophiles de synthétiser des dérivés réactifs de l'oxygène tels que le super-oxyde (O₂⁻) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dont les interactions permettent de tuer un grand nombre d'agents pathogènes des mammites donc *S. aureus* (129). Le second mécanisme consiste en la libération de granules contenant des peptides antimicrobiens dont les défensines et les cathélicidines qui ont un large spectre, quel que soit le type de germe. Enfin les neutrophiles peuvent aussi émettre dans le milieu extracellulaire des molécules nucléaires et granuleuses (Neutrophil Extracellular Trap), qui vont piéger les agents pathogènes Gram + ou Gram -, dégrader leurs facteurs de virulence, et maintenir sur eux une fonction bactériostatique (132). Les deux premiers mécanismes peuvent entraîner de graves lésions du tissu mammaire s'ils sont trop forts ou mal régulés (133, 134). Ainsi l'apoptose des neutrophiles est une étape fondamentale afin que la réponse inflammatoire ne devienne pas néfaste pour l'organisme. Elle est achevée par les macrophages qui phagocytent les débris cellulaires et les neutrophiles apoptotiques.

Il a été montré chez la vache, lors de mammites à *S. aureus* expérimentales, que l'effet bactéricide des neutrophiles variait au cours de l'épisode infectieux. Pour cela, la capacité des neutrophiles à ingérer des particules fluorescentes en latex a été quantifiée en utilisant la cytométrie de flux. Le pourcentage de neutrophiles ayant ingéré ces particules variait de 15 à 80%, et tendait à être maximale au moment du pic de recrutement cellulaire. De plus, le nombre moyen de particules ingérées était de 1 ou 2 particules par neutrophile, avec cependant non moins de 17% des cellules qui en ingéraient 4 ou plus (135).

4.1.2.2.3. Les lymphocytes

Les lymphocytes jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire adaptative, car ils possèdent des récepteurs membranaires leur permettant de reconnaître spécifiquement un antigène, et ainsi de mettre en place une réponse adaptée et mémoire. Dans la mamelle, la population de lymphocytes est dominée par les lymphocytes T (136). Les lymphocytes T peuvent être subdivisés entre les lymphocytes T $\alpha\beta$, qui comportent les lymphocytes CD4+ (T-auxiliaires) et les lymphocytes CD8+ (de type T-cytotoxiques ou T-suppresseurs), et les lymphocytes T $\gamma\delta$ peu nombreux dans la mamelle et le lait (136). En fonction de la localisation tissulaire et du stade de lactation, la proportion de ces types cellulaires peut varier, mais tous augmentent progressivement durant la gestation et diminuent significativement durant la lactation (137). Les CD4+, qui sont le type cellulaire prédominant dans l'espèce caprine contrairement à l'espèce bovine et ovine où les CD8+ prédominent, sont situés majoritairement dans le tissu conjonctif mammaire (138). Les autres types cellulaires sont plutôt retrouvés dans l'épithélium (137).

Lors de mammite, il y a une multiplication et une différenciation des cellules CD4+ suite à la reconnaissance des complexes antigène-CMH II présentés par les lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques (136, 139). Le message est transmis aussi par des cytokines qui vont orienter la différenciation soit en lymphocytes T auxiliaire de type 2 (Th2) via l'IL-4 principalement, soit en lymphocytes T auxiliaires de type 1 (Th1) via l'IL-12 entre autres. Les lymphocytes Th1 sécrètent les cytokines IL-2, IFN γ et favorisent la réponse cellulaire médiée par les lymphocytes CD8+. Les lymphocytes CD8+ ont des fonctions cytotoxiques, grâce à leurs granules contenant de la perforine et des sérine-estérases, ou une fonction suppressive qui permettrait de réguler la réponse immune. Cette réponse est particulièrement efficace sur les germes intra cellulaires. Les cellules Th1 vont quant à elles sécréter les cytokines IL-4, IL-5 et IL-10 favorisant la réponse humorale portée après

différentiation par les lymphocytes B qui se différencient en plasmocytes producteurs d'anticorps efficaces contre les germes extracellulaires (136).

A la différence des lymphocytes T, le pourcentage de lymphocytes B reste constant tout au long de la lactation, y compris lors d'infection (140, 141). Les plasmocytes sécrètent des anticorps spécifiques du germe impliqué. Quatre isotypes d'anticorps ont un rôle important au niveau mammaire. Les IgM, IgG1 et IgG2 favorisent l'opsonisation en augmentant l'efficacité phagocytaire des neutrophiles et macrophages, et les IgA favorisent l'élimination des bactéries lors de la traite en les agglutinant et en évitant leur pénétration dans les épithéliums. L'isotype IgG1 est majoritaire dans une mamelle saine, surtout lors de la phase colostrale. En cas d'infection les IgG2, qui sont les opsonines les plus efficaces pour les neutrophiles, passent massivement du sang vers la mamelle, en même temps que les neutrophiles (116, 142).

4.2. Conséquences de l'inflammation mammaire sur les caractéristiques du lait

4.2.1. La concentration de cellules somatiques (CCS)

Comme nous l'avons vu, le dénombrement des cellules somatiques dans le lait est une technique indirecte couramment utilisée en élevage laitier pour suivre l'état de santé mammaire à l'échelle individuelle ou du troupeau, si elle est appliquée au lait de tank. Les valeurs de CCS sont plus élevées chez la chèvre, même lorsque la mamelle est considérée comme saine. Elles varient entre 270.10^3 cellules/mL et $2\ 000.10^3$ cellules/mL, alors que chez la vache et la brebis, elles se situent entre 10.10^3 et 200.10^3 cellules/mL (27). Aux Etats-Unis, la Food and Drug Administration a défini un seuil réglementaire de $1\ 000.10^3$ cellules/mL à ne pas dépasser chez la chèvre (117). Dans l'Union Européenne, il n'existe pas de vrai consensus pour la chèvre. Cependant, le Règlement (CE) N°853/2004 fixe un seuil maximal de $1\ 500.10^3$ cellules/mL pour le lait cru des autres espèces que la vache, et ce seuil est de 500.10^3 cellules/mL pour le lait cru destiné à la fabrication de produits sans traitement thermique (143).

4.2.1.1. Différenciation des cellules somatiques chez la chèvre

Pour une mamelle indemne d'infection sur la base du résultat d'une analyse bactériologique, on estime selon les techniques de comptage utilisées et les études, que les

neutrophiles représentent entre 45 et 90% des cellules somatiques du lait de chèvre, les macrophages 15 à 41% et les lymphocytes 7 à 20% (42, 117, 144). Les nouvelles technologies associant la cytométrie de flux et des marqueurs fluorescents, permettent même de différencier les neutrophiles vivants, qui représentent de 49 à 82% des CCS, des neutrophiles morts dont la proportion est comprise entre 4 et 22% (42). Enfin selon les études et les techniques utilisées, les cellules épithéliales représentent 1 à 6% des cellules somatiques totales.

Dans l'espèce bovine, l'évolution de la CCS a été mise en relation avec l'évolution relative des différentes populations cellulaires (145). Ainsi les analyses statistiques ont révélé une corrélation significative entre le pourcentage de neutrophiles et la CCS. A l'inverse, la corrélation est négative pour le pourcentage de lymphocytes et aucune corrélation significative entre le pourcentage de macrophages et la CCS n'a été établie (Annexes 7 et 8).

4.2.1.2. Facteurs de variation physiologiques

En élevage bovin, de nombreuses études ont montré que le résultat du comptage des cellules somatiques était un bon indicateur de la santé mammaire, car une infection bactérienne est une cause majeure d'augmentation de la CCS. Cependant en élevage caprin, la relation entre infection bactérienne et augmentation de la CCS n'est pas aussi simple, car de nombreux facteurs non infectieux ont un impact important sur les fluctuations de CCS. Pour certains auteurs, 90% des variations des CCS ne seraient pas dues à des infections mammaires (146). Les principaux facteurs de variation sont, par ordre décroissant : le stade de lactation, le rang de lactation, la variabilité journalière et la fraction de lait analysée.

4.2.1.2.1. Les facteurs liés à l'animal

Le stade de lactation est le principal facteur de variation. Le CCS augmente au fur et à mesure de l'avancée de la lactation (1). La moyenne de CCS pour une mamelle saine peut rester aux alentours de $200 \cdot 10^3$ cellules/mL durant les trois premiers mois de lactation et augmenter progressivement pour atteindre à la fin de la lactation, des valeurs autour de $1000 \cdot 10^3$ cellules/mL (Annexe 9).

Certains auteurs expliquent ce phénomène par un effet de concentration, car la production de lait baisse au fur et à mesure des semaines, et ainsi la concentration des cellules somatiques augmente de manière opposée (146).

D'autres études ont montré que ce facteur était modifié par le rang de lactation de la chèvre. Ainsi, les CCS étaient relativement basses en début de lactation avec une moyenne de 200.10^3 cellules/mL à 15 jours de lactation pour les chèvres en première lactation et de 250.10^3 cellules/mL pour les chèvres en 5^{ème} lactation. À 285 jours de lactation les chèvres en première lactation atteignaient des CCS autour de 500.10^3 cellules/mL alors que l'augmentation de la CCS était beaucoup plus importante chez les chèvres en 5^{ème} lactation avec une moyenne de $1\ 150.10^3$ cellules/mL (117).

Ces augmentations de CCS sont dues majoritairement à une augmentation du nombre de neutrophiles. En effet, au cours de la lactation, la proportion moyenne des neutrophiles augmente de 45,8% à 70,3%, alors que les autres populations cellulaires diminuent proportionnellement. De plus, les neutrophiles augmentent d'une proportion moyenne de 52% en première lactation à 69% à la 4^{ème} lactation, alors que les pourcentages de macrophages et surtout de lymphocytes diminuent significativement (147).

De plus, il existe une très grande variabilité journalière. Certaines études ont montré que la valeur individuelle chez une chèvre pouvait varier d'une valeur de 200.10^3 cellules/mL pendant plusieurs jours à plus de $2\ 000.10^3$ cellules/mL le lendemain, pour revenir vers 200.10^3 cellules/mL le surlendemain. Ces fortes variations, peuvent être la source de biais majeur dans toutes les études sur les CCS dans cette espèce (148) (Annexe 10).

La majorité des études s'accordent pour dire qu'une forte prolificité augmente significativement la CCS (149), et que cela est indépendant du nombre de chevreaux que la mère allaite ; les lésions infligées au moment de la tétée en seraient la cause (106). Cependant certaines études ne trouvent pas d'effet significatif de la prolificité.

Enfin, une augmentation transitoire significative de la CCS durant l'œstrus est notée chez la chèvre, et cette augmentation est plus marquée chez les chèvres ayant déjà une infection mammaire (1). Le mécanisme n'est pas connu mais serait indépendant d'un effet concentration par diminution de la production laitière (150).

4.2.1.2.2. Les facteurs liés à la traite

On peut distinguer deux fractions de lait lors de la traite. La première extraite manuellement avant la traite, qui sert souvent pour le contrôle bactériologique et l'estimation visuelle de la CCS, puis la fraction de traite, sur laquelle les contrôles laitiers sont effectués. Les études concordent pour montrer que la seconde fraction est plus riche en cellules

somatiques que la première (34, 96, 152). Par exemple, pour une collection de 600 échantillons, la moyenne était de 998.10^3 cellules/mL pour la première fraction contre 1139.10^3 cellules/mL pour la seconde (151).

La technique de traite, manuelle ou mécanique, ne semble pas avoir d'influence sur les résultats des CCS, contrairement au moment de la traite. En effet la CCS est de 17% à 78% plus élevée selon les études, lorsque le lait de la traite du soir est analysé par rapport à celui du matin. Une explication vient de l'effet dilution, car le volume de lait extrait de la traite du matin est plus grand et ainsi les cellules somatiques sont plus diluées (34).

4.2.1.2.3. Les facteurs liés à la conduite d'élevage

L'alimentation peut avoir un impact sur la CCS, particulièrement lorsqu'elle est déséquilibrée en azote, énergie ou minéraux, ou lorsqu'elle provoque des désordres métaboliques tels que l'acidose (152, 153). De plus, il semble que les chèvres recevant une ration basée uniquement sur du pâturage auraient des valeurs de CCS significativement plus basses que celles recevant une ration distribuée en stabulation (152).

D'autres effets peuvent entraîner une augmentation de la CCS. Il s'agit du stress, lors de la manipulation des chèvres, de la saison, du statut parasitaire ou encore de la race (34).

4.2.1.3. Facteurs de variation pathologiques : les infections mammaires

Lorsqu'une héli-mamelle est infectée, la CCS augmente significativement, à cause de la mobilisation des cellules immunitaires dans les tissus infectés, et également à cause de la diminution de la production de lait qui a un effet direct sur la concentration des cellules. Ainsi la moyenne peut changer de 417.10^3 cellules/mL (SE=72) dans le lait de mamelles indemnes d'infection bactérienne à $1\ 750.10^3$ cellules/mL (SE=197) sur des mamelles infectées par un Staphylocoque Coagulase Négatif (SCN) (4). De plus, des modifications notables de la formule cellulaire ont été établies. Sur une étude comparant des mamelles saines à des mamelles infectées par un SCN, on obtient une augmentation significative du pourcentage de neutrophiles passant d'une moyenne de 80,9% (SD=9,3) pour la première catégorie à 86,6% (SD= 6,7) lors d'inflammation. La moyenne du pourcentage de macrophages diminue significativement de 15,0% (SD=7,7) à 11,4% (SD=6,4). Enfin le pourcentage de lymphocytes diminue de façon non significative de 4,2% (SD=3,9) à 2,7% (SD=1,2) (42). Il a été montré chez la vache qu'une forte augmentation de PMN était le signe d'une infection à

expression clinique (111), alors qu'une augmentation de PMN morts suggérerait un processus subclinique (41).

Cependant l'évolution de la CCS et de la proportion des cellules qui la composent, est modulée par l'agent bactérien en jeu. Ainsi on obtient des différences non négligeables des valeurs de CCS, selon que l'infection est due à un SCN ou à d'autres bactéries (*S. aureus*, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium pyogenes*), avec des différences d'un facteur 3 entre les CCS (40).

Certains auteurs classent donc les bactéries associées aux mammites en deux catégories : les agents pathogènes majeurs (Staphylocoques Coagulase Positifs dont *S. aureus*, les Streptocoques et les Coliformes) responsables de mammites sévères, et les agents pathogènes mineurs dont les SCN, responsables de mammites modérées (154). Cette classification, établie pour les mammites bovines, a été largement reprise dans des études sur l'espèce caprine (1, 155). Chez la chèvre, *S. aureus* est reconnu comme un agent pathogène majeur, tout comme les Streptocoques (59, 94, 156–158). Cependant l'influence de l'espèce de SCN sur l'augmentation de la CCS reste un sujet de controverse dans l'espèce caprine. En effet, certaines études affirment qu'il n'y a pas de différence significative entre les différentes espèces de SCN (59, 97, 158). D'autres mettent en évidence l'effet de certains SCN qui se rapprochent de ceux d'un agent pathogène majeur. Cependant elles divergent sur la liste des espèces de SCN en cause. Une étude sur 359 échantillons collectés sur des glandes infectées a montré une augmentation significative des CCS avec *S. simulans* et *S. epidermidis* (94). D'autres études confirment cette tendance, mais seulement pour *S. epidermidis* (82, 95), alors même que l'on trouve dans d'autres études des CCS relativement basses pour cette espèce, même plus basses que pour *S. simulans* ou *S. chromogenes* (59). Enfin, une étude a montré que, contrairement à la brebis, il n'existe pas de différence chez la chèvre quant à l'augmentation de la CCS entre les SCN résistants et ceux sensibles à la novobiocine (159).

L'espèce de l'agent infectieux semble aussi avoir un effet sur la durée du pic de CCS chez la vache. Ainsi les mammites cliniques à *E. coli* sont associées à un pic significativement plus court de la concentration de cellules somatiques dans le lait, alors que les mammites associées à *S. aureus* provoquent une augmentation de la CCS longue (160). De plus, le temps de latence entre le moment de l'infection et le début du pic de la réponse immunitaire dépend de l'espèce bactérienne mise en jeu (22, 131).

Lorsque l'on différencie les types cellulaires en les comparant aux CCS, on remarque alors que le pourcentage de neutrophiles augmente drastiquement lors d'une infection par un agent pathogène majeur, comme *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus intermedius* ou *Staphylococcus aureus*, par rapport aux échantillons non infectés ou infectés par un agent pathogène mineur. Concernant les macrophages, leur pourcentage est plus élevé lors d'infection avec une forte concentration d'agents pathogènes mineurs. Et enfin, le type d'infection n'a pas d'effet significatif sur le pourcentage de lymphocytes. Dans cette étude, le pourcentage d'éosinophiles a aussi été étudié et évolue de façon similaire à celui de neutrophiles (157). Une autre étude chez la chèvre a montré quant à elle, que le recrutement de lymphocytes T était plus important lors d'une infection avec *S. aureus* qu'avec *S. epidermidis* (25).

4.2.2. Influence des mammites sur les autres paramètres du lait

Les prélèvements de lait sur une mamelle négative au CMT, contiennent en moyenne 38.9 g/L (SE=1.1) de matière grasse, 34.2 g/L (SE=0.5) de protéines dont 28.1 g/L (SE=0.7) de caséine, et 47.0 g/L (SE=1.0) de lactose (4).

Lors d'une infection, la physiologie de la mamelle est perturbée par la réponse immunitaire. En effet, des dommages au niveau des membranes cellulaires des lactocytes voire de la barrière endothéliale, sont provoqués par l'action des toxines microbiennes et des produits métaboliques. Ces altérations ont de multiples conséquences sur la composition du lait.

Une diminution significative de la quantité de lait et de lactose est notée. En effet, le lactose, principal constituant du lait, est synthétisé par les lactocytes. Lorsqu'ils sont altérés, leur capacité de production est alors amenuisée. Il a été établi qu'une teneur inférieure à 4,33% de lactose pouvait même prédire l'existence d'une mammite (161).

En ce qui concerne la matière grasse, il n'y a pas de modification significative selon le statut bactériologique de la mamelle (4, 156). Cependant des études ont montré que les laits dont les CCS sont élevées avaient une teneur significativement réduite en matière grasse (156, 162). Ainsi les conséquences d'une infection mammaire sur le taux de matière grasse ne sont pas encore claires chez la chèvre.

Les taux de protéines totales et d'albumine augmentent significativement dans les mamelles infectées. Cependant le taux de caséine n'augmente pas, car il y a une protéolyse

marquée due à une augmentation significative de l'activité de la plasmine (4, 163). En effet, une étude a montré que l'augmentation significative des protéines totales s'explique essentiellement par une augmentation des protéines du lactosérum, particulièrement des immunoglobulines, et des protéines solubles qui sont les protéines de l'inflammation. A contrario, la concentration en caséines reste stable dans cette étude (164).

Ainsi ces modifications sur les paramètres du lait lors d'infection sont défavorables pour la quantité de lait mais aussi pour la qualité de la transformation fromagère.

Chapitre 2 : Etude expérimentale

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Procréation des animaux

1.1.1. L'élevage

Les chèvres sélectionnées pour cette étude proviennent de l'Unité Expérimentale INRA de Bourges. Les 53 chèvres, de race Alpine, sont issues de deux lignées divergentes sur le critère de la CCS. La lutte s'étale de début août à début octobre grâce à la synchronisation des chaleurs, et 50% des inséminations sont artificielles. Après cinq mois de gestation, les mises-bas sont donc groupées entre fin janvier et mi-mars.

Les chèvres sont traites deux fois par jour dans une salle de traite rotative de 14 places. Chaque traite dure 1h30-1h45 pour 230 chèvres environ. Il n'y a pas de pré-trempe, ni post-trempe en fin de traite. La production moyenne est de 700-750L de lait/chèvre/an. Les chèvres sont nourries avec du foin de luzerne distribué à volonté auquel est ajouté des concentrés. Elles sont réparties en lots de 30 à 40 chèvres environ, en fonction de la date de mise bas ; les animaux disposent de 1,6 m² par mère dans un système zéro pâturage. Ce système d'élevage permet d'éliminer une majeure partie du risque parasitaire. Lors de la dernière coprologie, réalisée sur 20% du troupeau en 2016, quelques individus n'étaient pas complètement naïfs et avaient une excrétion résiduelle d'œufs de strongles.

L'élevage n'est pas indemne de CAEV, même si des précautions particulières sont mises en place pour limiter la transmission du virus de la mère au chevreau. En effet, le chevreau ne tète pas sa mère. Le plus tôt possible après la mise bas, la traite du colostrum est réalisée avant d'être thermisé à 56°C pendant 60 minutes afin d'inactiver le virus, puis distribué au chevreau à l'aide d'un biberon.

1.1.2. Les lignées divergentes

Dans notre étude, 23 boucs préalablement testés sur descendance, ont été sélectionnés pour former deux groupes avec un maximum de divergence sur le critère CCS. L'écart entre les index CCS de ces 2 groupes est marqué, et les moyennes présentaient une différence significative ($P < 0,0001$) de près de 3 écart-types génétiques. De plus, les index CCS étaient précis (coefficient de détermination $CD > 0,80$) (21). Ainsi, 12 boucs avec des index CCS négatifs (-1,5 en moyenne) et 11 boucs avec des index CCS positifs (+1,3 en moyenne) ont été accouplés au cours de deux années (2008 et 2009) aux chèvres disponibles dans l'Unité

Expérimentale INRA de Bourges. Les animaux issus du premier groupe de boucs constituent la lignée dont les index sont défavorables et elle est plus sensible aux mammites ; elle sera nommée « CCS+ ». Au contraire la seconde lignée possède des index CCS positifs, donc favorables ; elle sera nommée « CCS-» car moins sensible aux mammites. Concernant les autres index laitiers et morphologiques, il n'y avait pas de différence significative entre les 2 groupes de boucs hormis l'index du taux butyreux reflétant la légère opposition génétique entre ce caractère et la CCS (19).

Pour maintenir un nombre suffisant d'animaux dans chaque lignée, chaque année les chèvres des groupes CCS+/- ont été mises à la reproduction avec des boucs dont les index sont similaires. En effet, un renouvellement est nécessaire, à cause des troubles de la reproduction, car les chèvres qui ne sont pas gravides à l'issue de la campagne laitière sont réformées. Ainsi au début de la campagne 2013, 29 chèvres de la lignée CCS+ et 24 chèvres de la lignée CCS- étaient disponibles pour ce projet.

1.2. Les prélèvements

Cinquante-trois chèvres ont été prélevées sur chaque hémi-mamelle à trois dates au cours de la campagne 2013: le 26 Mars, le 28 Mai et le 24 Septembre, correspondant respectivement à un stade de lactation précoce, moyen et avancé. Elles étaient toutes en première ou deuxième lactation. Ces échantillons ont été prélevés lors de la traite du matin, sur une fraction de lait après l'élimination des premiers jets. Les trayons étaient préalablement désinfectés avec une gaze imprégnée d'alcool, 40 mL de lait étaient prélevés de manière aseptique, et les échantillons étaient conservés à 4°C avant d'être expédiés dans les différents laboratoires dans la journée suivant le prélèvement. Ces échantillons ont servi à la bactériologie et à la détermination des CCS de chaque hémi-mamelle.

En parallèle, des prélèvements sur le lait de la traite de chaque chèvre ont été réalisés aux mêmes dates par le contrôle laitier. La quantité de lait produite par chèvre, le taux protéique, le taux butyreux et la CCS de la mamelle entière ont ainsi été associés aux autres données.

1.3. Analyse des échantillons de lait

1.3.1. Détermination des CCS

Les CCS ont été mesurées par la méthode de cytométrie de flux de type Fossomatic®. Les comptages des cellules dans les échantillons de chaque hémimamelle ont été effectués par le Laboratoire Interprofessionnel du laitier Centre Ouest (LILCO) de Surgères alors que ceux correspondant à la mamelle entière ont été réalisés par le contrôle laitier. Les échantillons étaient traités 12 heures maximum après le prélèvement et ils étaient conservés à température ambiante dans des tubes contenant du bronopol.

1.3.2. La cytométrie en flux (FACS)

Dans notre étude, un marqueur nucléique fluorescent a été utilisé, le SYTO 13. Ce marqueur a été reconnu comme étant approprié dans la différenciation des cellules somatiques du culot cellulaire obtenu après centrifugation chez la vache (165). Il a aussi été utilisé dans une étude chez la chèvre, montrant des résultats de comptage cohérents avec les techniques de référence (42). De plus Vybrant DyeCycle Ruby stain un marqueur perméant, qui ne peut entrer que dans les cellules vivantes, a permis de différencier les cellules vivantes des cellules mortes, en particulier les neutrophiles (166, 167).

Les prélèvements étaient collectés dans des tubes contenant une solution saline isotonique de volume équivalent (solution d'Alsever) et ils étaient conservés à + 4°C. Ils étaient ensuite centrifugés à 800 × g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot était lavé deux fois avec du PBS, 20 mM d'EDTA, et de la solution d'Alveser à 20%, puis mis en suspension dans du HBSS (Hanks' balanced salts solution) et filtré à travers un tamis de 40 µm. Les cellules étaient incubées avec 5 µM de SYTO 13 et 5 µM de Vybrant DyeCycle Ruby stain (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) dans du HBSS pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante. Les mesures de cytométrie en flux étaient réalisées avec un cytomètre MACSQuant (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne). Les données étaient analysées à l'aide du programme FlowJo software (TreeStar, San Carlos, CA) donnant les pourcentages de chaque type de leucocytes. Les concentrations de PMN vivants, PMN morts, macrophages et lymphocytes étaient obtenues en multipliant les pourcentages de chaque type de leucocytes avec la CCS par hémimamelle.

1.3.3. Bactériologie

Deux types d'analyses bactériologiques ont été réalisées. Tout d'abord une bactériologie conventionnelle réalisée par le Laboratoire Départemental du Cher. Les prélèvements étaient conservés entre 0 et + 4°C et étaient analysés dans les 24h suivant le prélèvement. Vingt microlitres de lait étaient étalés sur une gélose Trypcase Soja, contenant 5% de sang de mouton. Quarante-huit heures après la mise à l'étuve à 37°C dans des conditions d'aérobiose, le nombre de colonies était estimé. Les colonies de même type suffisamment développées étaient alors identifiées à l'aide de galeries API. Ainsi une bactériologie positive correspondait à un échantillon de lait d'une hémimamelle permettant l'identification d'une, voire 2 espèces bactériennes ; une bactériologie négative correspondait à un échantillon de lait d'une hémimamelle sans isolement.

En parallèle les échantillons étaient analysés par une technique de bactériologie moléculaire mise au point à l'ENV de Toulouse. Elle combine une technique d'extraction originale et une PCR quantitative moyen débit. L'extraction est composée d'une étape de centrifugation du lait en plaques 96 puits, d'une lyse enzymatique et de l'extraction semi-automatisée de l'ADN avec le robot BioSprint96. Concernant la qPCR, la cible était l'ADN ribosomal 16S, dont la séquence est hautement conservée. C'est donc la cible génique idéale pour détecter toutes les eubactéries (168). De plus, l'homologie de séquence est de l'ordre de 90 à 99% pour 29 espèces de staphylocoques. Deux sondes étaient donc utilisées. La sonde « UniProbe P1033R » permettant de détecter toutes les eubactéries et la sonde « SProb 891F » permettant de détecter uniquement les staphylocoques. La quantification est réalisée en parallèle de celle d'un extrait ADN de *S. aureus* qui a été précisément quantifié et dilué pour produire une référence externe. Les résultats de la qPCR sont exprimés en équivalents génomes bactériens/mL.

1.3.4. Analyses statistiques

Les variables étudiées sont i) la concentration des cellules somatiques du lait (CCS), ii) la concentration des neutrophiles vivants (PMN), iii) celle des neutrophiles morts (Dead_PMN), iv) celle des macrophages (Macro) et v) celle des lymphocytes (Lympho). Ces variables n'ont pas une distribution normale, d'après le test de Shapiro-Wilk (la variable est considérée normale si la valeur p du test est supérieure à 0,05). Nous avons donc travaillé sur

la transformée au logarithme de base 2 de la CCS (SCS), et la transformée au logarithme des autres variables, permettant de normaliser la distribution des données :

$$SCS = 3 + \log_2\left(\frac{CCS}{100000}\right)$$

Dans un second temps nous avons analysé le nombre d'équivalents génomes dénombrés par la bactériologie moléculaire. La répartition de cette variable n'étant pas normale, nous avons transformé ces valeurs en logarithme de base 2, afin d'obtenir une distribution normale. Enfin dans une troisième partie, nous avons étudié la quantité de lait produite à chaque traite, ainsi que le taux protéique, et le taux butyreux du lait. Le taux protéique avait une distribution normale, contrairement à la quantité de lait produite par traite et au taux butyreux, dont nous avons utilisé la transformée.

Les caractères répétés de la production individuelle (quantité journalière de lait et taux au contrôle laitier officiel, les concentrations de cellules totales, de neutrophiles, de macrophages, de lymphocytes et de neutrophiles morts) ont été analysés à l'aide de modèles mixtes (proc MIXED, SAS®) incluant les effets fixes de la lignée (2 classes), du stade de lactation (3 classes), du numéro de lactation (2 classes), de l'âge de la chèvre (2 classes), du côté de l'hémimamelle (2 classes) et les effets aléatoires de l'animal et de l'erreur. Les interactions entre ces 5 effets fixes ont été testées. La répétition des mesures individuelles au cours de la lactation pour chacune des deux hémimamelles a été prise en compte dans une structure de matrice de variance-covariance résiduelle de type autorégressive de 1er ordre intra-hémi-mamelle (option repeated de SAS, Typ=UN2*2@AR(1)).

Dans tous les résultats, on considèrera comme « significatif » des valeurs de p inférieures à 0,05 et « très significatif » p des valeurs de p inférieures à 0,0001.

2. RESULTATS

2.1. Composition cellulaire

Dans notre étude la valeur moyenne de la concentration des cellules était de $1\,035.10^3$ cellules/mL (SD= $2\,683.10^3$) pour l'ensemble des échantillons ; 696.10^3 cellules/mL (SD= $1\,320.10^3$) pour les échantillons dont la bactériologie conventionnelle était négative et $1\,365.10^3$ cellules/mL (SD= $3\,512.10^3$) pour les échantillons ayant conduit à un isolement. Concernant la différence entre les deux lignées divergentes sélectionn

ées sur le critère CCS, la différence était significative avec une moyenne de 830.10^3 cellules/mL (SD= $3\ 109.10^3$) pour la lignée CCS- et $1\ 210.10^3$ cellules/mL (SD= $2\ 253.10^3$) pour la lignée CCS+. Ces résultats confirment ceux obtenus au cours des campagnes laitières précédentes sur les chèvres de la sélection divergente. (20)

La composition cellulaire du lait a été décomposée en pourcentages de neutrophiles vivants (PMN) ou morts (Dead_PMN), de macrophages (Macro) et de lymphocytes (Lympho), grâce à l'analyse par la cytométrie en flux (Figure 8).

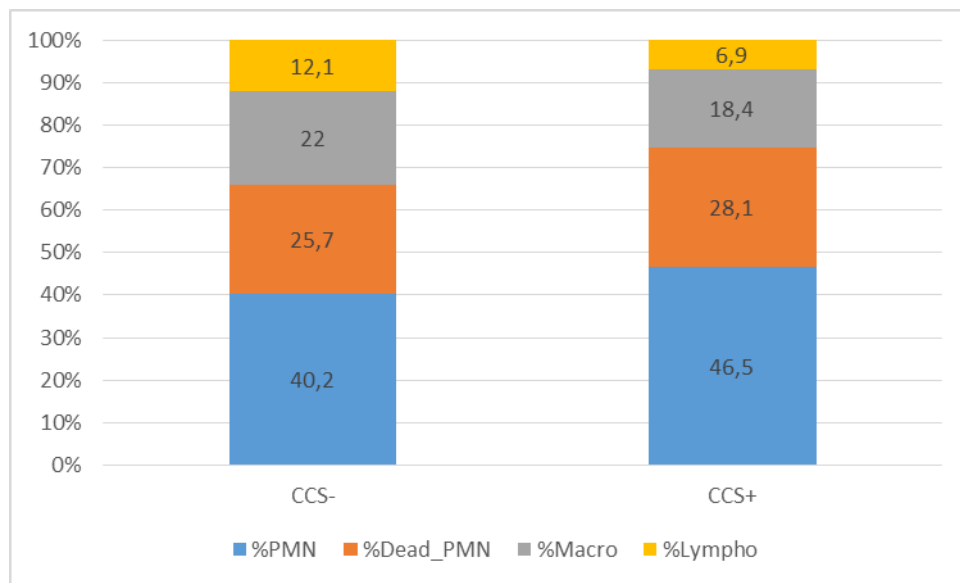


Figure 8 : Composition des cellules somatiques dans chaque lignée de chèvres

Sur les 166 échantillons issus de chèvres CCS+, le pourcentage moyen de neutrophiles, vivants et morts, était supérieur à celui des 138 échantillons issus de chèvres CCS-. Au contraire, le pourcentage moyen de lymphocytes était supérieur dans la lignée CCS-. Ces différences n'étaient toutefois pas significatives.

2.2. Profils cellulaires en fonction de la lignée et du statut infectieux

Pour avoir une première idée de l'impact d'une infection mammaire sur le profil cellulaire en fonction de la lignée, quatre catégories d'échantillons ont été créées (Figure 9). Les catégories 1 et 2 correspondent à des échantillons de lait de chèvres CCS- pour lesquels la bactériologie conventionnelle est négative pour la catégorie 1 et positive pour la catégorie 2. Les catégories 3 et 4 correspondent à des échantillons de lait de chèvres CCS+ pour lesquels

la bactériologie conventionnelle est négative pour la catégorie 3 et positive pour la catégorie 4. Chaque catégorie compte respectivement 73, 65, 74 et 92 échantillons.

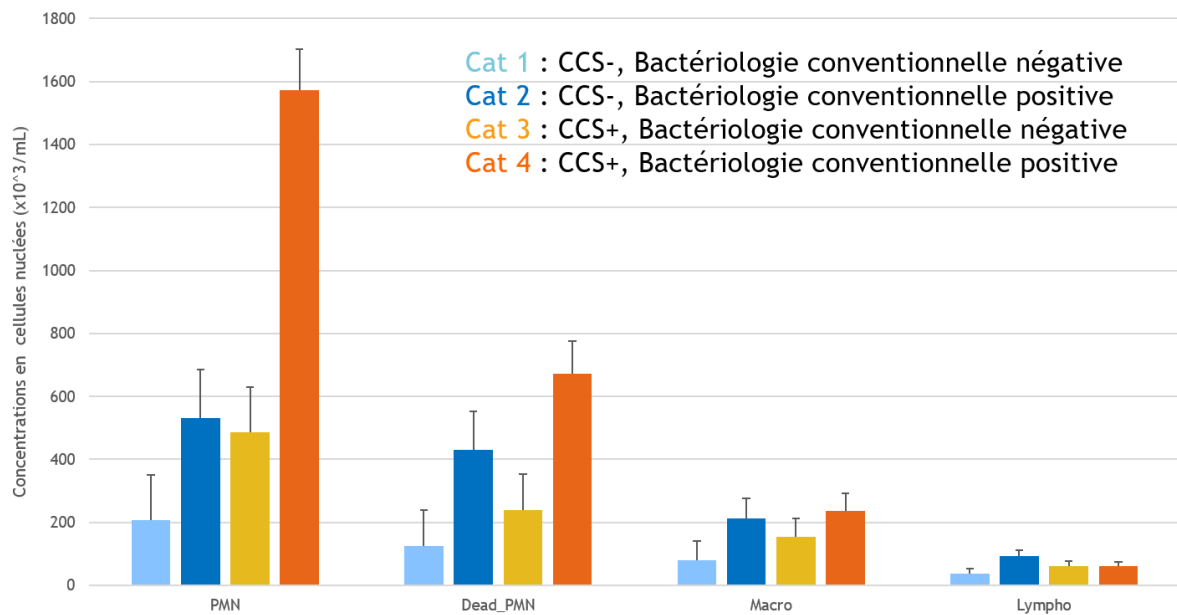


Figure 9 : Décompte de chaque type cellulaire en fonction de la lignée et du statut infectieux des chèvres

Les moyennes du nombre total de cellules nucléées sont de 451.10^3 cellules/mL (SD= 150.10^3) pour la catégorie 1, 1269.10^3 cellules/mL (SD= 437.10^3) pour la catégorie 2, 941.10^3 cellules/mL (SD= 1437.10^3) pour la catégorie 3 et 1434.10^3 cellules/mL (SD= 2747.10^3) pour la catégorie 4. Lorsque l'on différencie les types cellulaires, les neutrophiles ou PMN (Polymorphonuclear neutrophil) sont dominants dans toutes les catégories, suivis des PMN morts (Dead_PMN), puis des macrophages (Macro) et enfin des lymphocytes (Lympho).

La quantité de PMN, morts et vivants, et de macrophages augmente fortement dans les échantillons infectés, quelle que soit la lignée. Concernant ces trois types cellulaires leur nombre est plus grand chez les chèvres CCS +, à statut infectieux équivalent.

Le nombre de lymphocytes dans les échantillons de lait des chèvres CCS- augmente lorsque la bactériologie est positive, contrairement à ceux des chèvres CCS+. Ils passent alors d'une moyenne de 38.10^3 lymphocytes/mL pour les échantillons dont la bactériologie est négative, à 94.10^3 lymphocytes/mL lorsque la bactériologie est positive. Lorsque la bactériologie est négative, les échantillons de lait des chèvres CCS+ contiennent plus de

lymphocytes que ceux de chèvres CCS-, alors que c'est l'inverse lorsque la bactériologie est positive.

2.3. Evolution de la proportion de chaque type cellulaire en fonction de la CCS

Dans notre étude, nous disposons de données acquises par cytométrie en flux qui permet de différencier les types cellulaires présents dans le lait. Cependant, en pratique, on ne dispose bien souvent que de la CCS qui est assez simple à obtenir et peu onéreuse via le contrôle laitier. Nous avons vu que lorsque la bactériologie est positive, les nombres de PMN, PMN morts, macrophages et lymphocytes augmentent, tout comme le nombre total de cellules. Ainsi nous avons analysé la corrélation entre le nombre de cellules d'un type et la CCS (Figures 10 et 11) (Annexes 11 et 12).

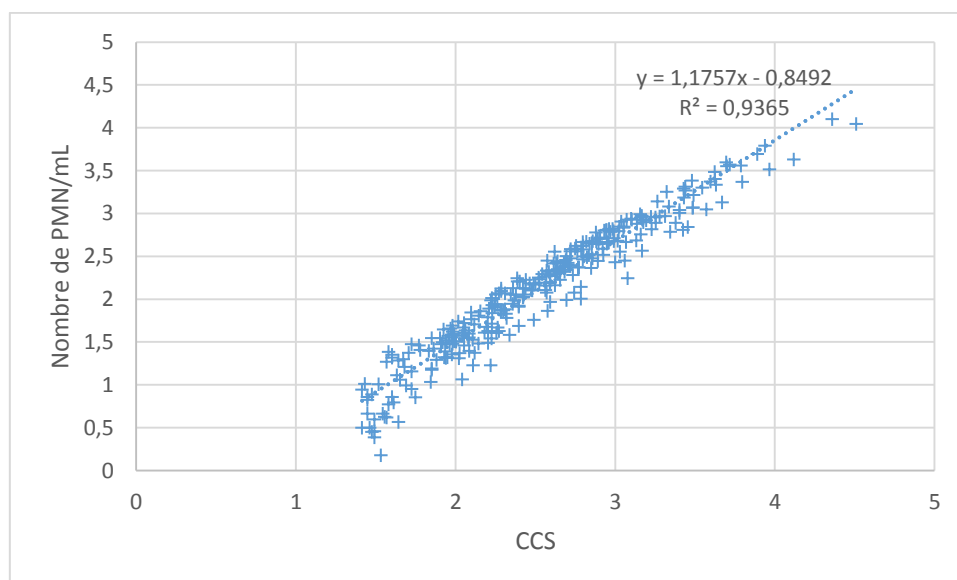


Figure 10 : Concentration en PMN en fonction de la CCS à l'échelle logarithmique avec la courbe de tendance associée

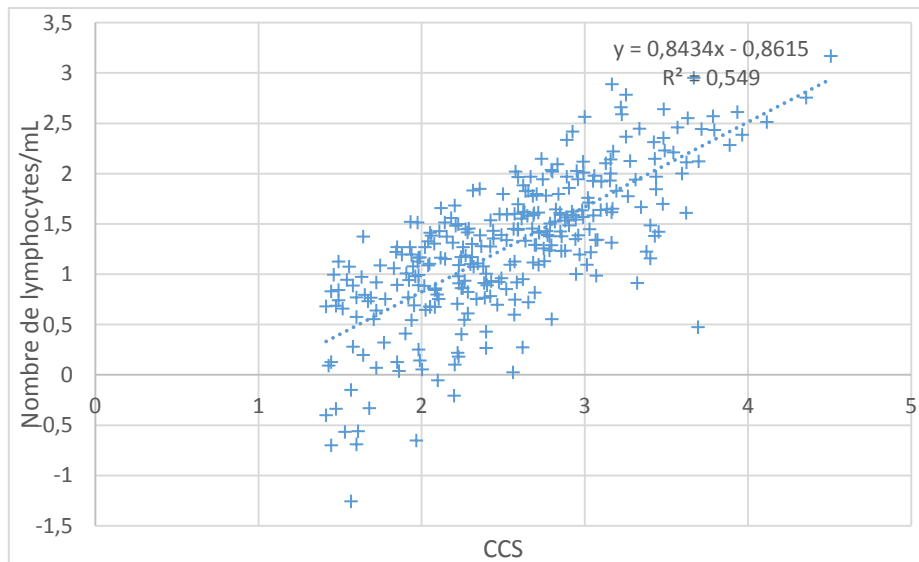


Figure 11 : Concentration en lymphocytes en fonction de la CCS à l'échelle logarithmique avec la courbe de tendance associée

Il existe une relation quasiment linéaire entre le nombre de PMN et la CCS ($R^2 = 0,94$). La corrélation est moins bonne pour les macrophages ($R^2 = 0,87$) et les PMN morts ($R^2 = 0,81$). Enfin elle est mauvaise pour les lymphocytes ($R^2 = 0,55$). Ainsi il semble que, malgré une corrélation satisfaisante pour les PMN, la variation individuelle soit importante et ne permette pas d'établir une relation directe entre chaque type cellulaire et la CCS. Ceci nous a poussé à étudier les différents facteurs pouvant influencer le profil cellulaire.

2.4. Facteurs influençant le profil cellulaire liés à l'animal

Les résultats des comptages cellulaires sont très variables d'après les Figures 10 et 11. On peut donc penser qu'il existe une grande variabilité inter-individuelle. Celle-ci peut en partie être expliquée par le statut infectieux de l'animal, comme le suggère la Figure 9. Cependant la variabilité intra-catégorie reste très grande. Ainsi nous avons choisi d'évaluer les caractéristiques propres à l'animal qui peuvent avoir une influence sur la concentration cellulaire (Tableau II). Il s'agit de la lignée de l'animal, de son rang de lactation, de son âge, du côté de l'hémimamelle prélevée et du stade de lactation de la chèvre au moment du prélèvement.

Tableau II : Significativité des effets liés à l'animal sur les concentrations des différents types de leucocytes

	Lignée	Stade de lactation	Rang de lactation	Âge	Côté
Log(PMN)	*** P < 0.0001	*** P < 0.0001	NS	NS	** P=0.0063
Log(Dead PMN)	*** P < 0.0001	*** P < 0.0001	NS	NS	NS
Log(Macro)	*** P < 0.0001	*** P < 0.0001	NS	NS	NS
Log(Lympho)	* P = 0,02	*** P < 0.0001	* P = 0.04	** P = 0.009	NS

*** $P < 0,0001$ ** $P < 0,001$ * $P < 0,05$ NS = « non significatif » = $P > 0,05$

2.4.1. Effet de la lignée

L'effet de la lignée est très significatif pour les PMN, PMN morts et les macrophages. Avec une valeur p plus grande ; il est également significatif pour les lymphocytes. Quel que soit le type cellulaire, la lignée CCS+ a des concentrations plus élevées pour tous les types cellulaires recensés. (Annexe 13)

2.4.2. Effet du stade de lactation

Les prélèvements ont été réalisés à trois dates correspondant au début, au milieu et à la fin de la lactation. A chacune de ces dates, ce sont respectivement 106, 102 et 96 échantillons qui ont été collectés. L'effet date est très significatif pour tous les types cellulaires. Quel que soit le type cellulaire, les concentrations sont plus élevées en fin de lactation (Annexe 14). Concernant les PMN et les macrophages, la concentration augmente significativement au fur et à mesure de la lactation, et particulièrement à la dernière date. Les PMN morts quant à eux ont des concentrations significativement plus élevées en début et en fin de lactation. Enfin le nombre de lymphocytes est plus élevé au début qu'au milieu de la lactation, puis augmente significativement en fin de lactation. Cependant, la quantité de lait produite est significativement plus basse en fin de lactation. Ainsi pour s'affranchir de l'effet dilution, nous avons aussi étudié les variables log(PMN x quantité de lait), log(Dead_PMN x quantité de lait), log(Macro x quantité de lait) et log(Lympho x quantité de lait). Pour toutes ces variables, l'effet date était très significatif.

2.4.3. Effet du rang de lactation

Parmi les chèvres de notre étude, 150 échantillons étaient issus de 26 chèvres en première lactation, contre 154 échantillons issus de 27 chèvres en seconde lactation. L'effet rang de lactation n'est significatif que sur la concentration de lymphocytes. En effet, les chèvres en 2^{ème} lactation ont significativement plus de lymphocytes dans le lait que les chèvres en première lactation (moyenne de log(Lympho) de 2,95 contre 2,57).

2.4.4. Effet de l'âge

A l'U.E. de Bourges, les chèvres sont inséminées tous les ans. Cependant certaines ne sont pas gravides à l'issue de la campagne de reproduction et elles sont conservées pour être mises à la reproduction l'année suivante. Ainsi toutes les chèvres en seconde lactation ont deux ans alors que parmi les chèvres en première lactation, 70 chèvres sont âgées de un an alors que 80 chèvres ont deux ans. L'effet de l'âge n'est significatif que sur la concentration de lymphocytes. Les chèvres de deux ans ont significativement plus de lymphocytes dans le lait que les chèvres âgées de un an seulement (moyenne de log(Lympho) de 3,06 contre 2,46).

2.4.5. Effet du côté de l'hémimamelle

Toutes les chèvres ont été prélevées aux deux hémimamelles. L'effet côté n'est significatif que sur la concentration des PMN. On compte significativement plus de PMN sur les hémimamelles gauches que les droites, alors qu'il n'y a pas de différence significative du taux d'infection, quelle que soit la technique de bactériologie utilisée.

2.4.6. Effet croisé du stade de lactation et de la lignée

Les deux principaux effets étant le stade de lactation et la lignée, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre ces deux effets (Figure 12). Quel que soit le type cellulaire, cette interaction n'est jamais significative ; cependant il est intéressant de relier les variations de la concentration en fonction de ces deux paramètres, au taux d'infection. Ainsi, 6 catégories ont été créées. Les catégories 1 et 2 regroupent les échantillons collectés en début de lactation, respectivement sur les chèvres CCS- et CCS+. Les catégories 3 et 4 regroupent les échantillons collectés en milieu de lactation, respectivement sur les chèvres CCS- et CCS+. Les catégories 5 et 6 regroupent les échantillons collectés en fin de lactation, respectivement sur les chèvres CCS- et CCS+. Chaque catégorie compte respectivement 48, 58, 46, 56, 44 et 52 échantillons.

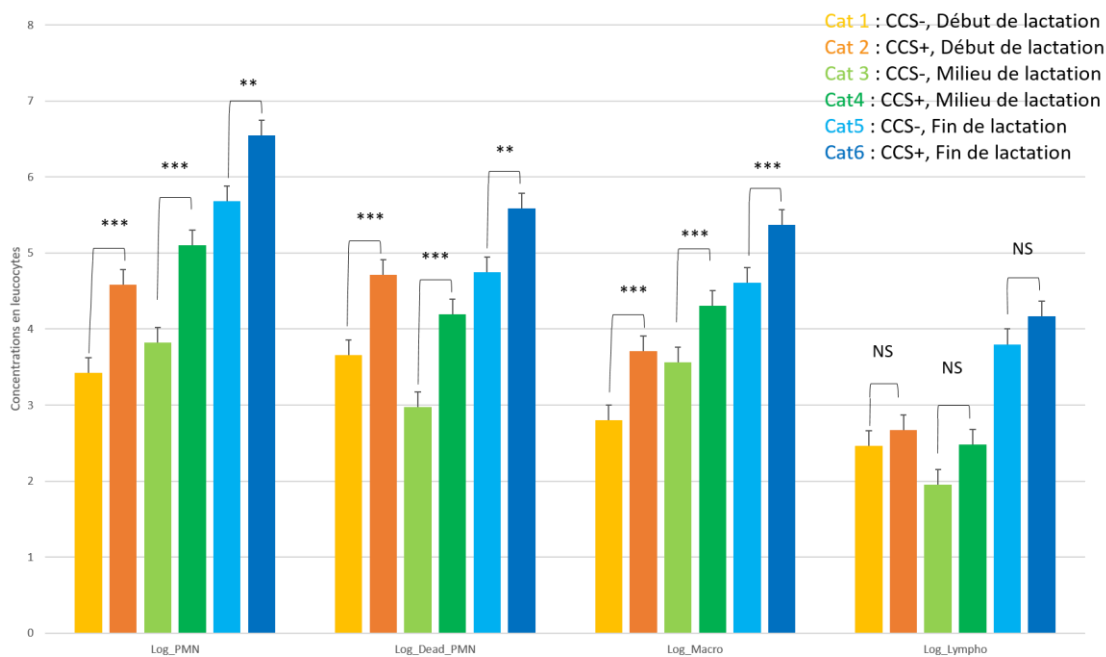


Figure 12 : Décompte de chaque type cellulaire en fonction de la lignée et du stade de lactation

*** $P < 0,0001$ ** $P < 0,001$ NS = « non significatif » = $P > 0,05$

Pour tous les types cellulaires, et pour une date donnée, le nombre de cellules par mL dénombrées dans les échantillons de lait prélevés sur des chèvres CCS+ est plus élevé. Cette différence est significative à toutes les dates pour les PMN, les PMN morts et les macrophages. Pour les lymphocytes, la différence n'est significative à aucune des trois dates. En parallèle, la bactériologie conventionnelle révèle un taux de prélèvements positifs plus élevés chez les chèvres CCS+ (Annexe 15).

La concentration des PMN et des macrophages, pour une lignée donnée, augmente significativement entre le milieu et la fin de la lactation. On remarque aussi une augmentation entre le début et le milieu de la lactation, qui n'est significative que pour les macrophages. Concernant les lymphocytes et les PMN morts, la concentration de cellules augmente significativement entre le milieu et la fin de la lactation dans les deux lignées. Entre le début et le milieu de la lactation, au contraire, il diminue, mais cette différence n'est significative que pour les PMN morts.

2.5. Etiologie des bactéries associées aux infections intra mammaires

2.5.1. Distinction entre les lignées

2.5.1.1. Bactériologie conventionnelle

Sur la campagne 2013, 304 échantillons ont été analysés en bactériologie conventionnelle. Parmi ceux-ci, 166 appartenaient à des chèvres de la lignée CCS+ contre 138 pour les chèvres de la lignée CCS-. Cinq échantillons n'ont pas mené à un résultat, par manque de lait ou à cause de la contamination de l'échantillon. Sur un échantillon, deux types bactériens ont été isolés, mais seul le dominant a été conservé dans les données pour l'analyse ultérieure, il s'agit de l'échantillon contenant *E. coli*.

Tableau III : Inventaire des germes isolés des échantillons de lait collectés dans notre étude

	CCS +	CCS -
Sterile	74	73
<i>S. epidermidis</i>	17	10
<i>S. caprae</i>	4	13
<i>Bacillus</i>	8	7
<i>S. hyicus</i>	9	5
<i>S. xylosus</i>	7	6
<i>S. chromogenes</i>	6	4
<i>S. aureus</i>	9	/
<i>S. lugdunensis</i>	7	
<i>S. capitis</i>	3	3
<i>S. cohnii</i>	4	1
<i>S. lentus</i>	2	2
<i>S. simulans</i>	4	/
<i>Micrococcus</i>	1	2
<i>S. hominis</i>	1	2
<i>S. warneri</i>	2	1
<i>Aerococcus</i>	/	2
<i>Corynebacterium</i>	/	2
<i>S. sciuri</i>	1	1
<i>Strepto. faecium</i>	2	/
<i>E. coli</i>	1	/
<i>Strepto. acidominimus</i>	1	/
<i>S. saprophyticus</i>	/	1
Non analysé	3	2
EFFECTIF	166	138

Sur la totalité des échantillons, 147 étaient stériles, c'est-à-dire qu'aucun isolement n'a été possible par la technique de bactériologie conventionnelle. Les autres échantillons ont permis d'isoler un seul type de bactérie. L'espèce bactérienne la plus fréquemment isolée,

toutes lignées confondues était *S. epidermidis*, (avec 27 observations sur les 304 échantillons soit 8,9%). Sa fréquence était plus grande dans la lignée CCS+. Ensuite on retrouvait *S. caprae* (17 isollements sur 304 échantillons soit 5,6%), *Bacillus* (15/304 soit 4,9%), *S. hyicus* (14/304 soit 4,6%), et *S. xylosus* (13/304 soit 4,3%). Certaines bactéries n'ont été isolées que chez les chèvres de la lignée CCS-, comme *Aerococcus*, *Corynebacterium* ou *S. saprophyticus*. Au contraire *S. aureus*, *S. simulans*, *Strepto. faecium*, *E. coli* et *Strepto. acidominimis* n'ont été isolées que dans les échantillons de lait prélevés chez des chèvres CCS+. (Tableau III)

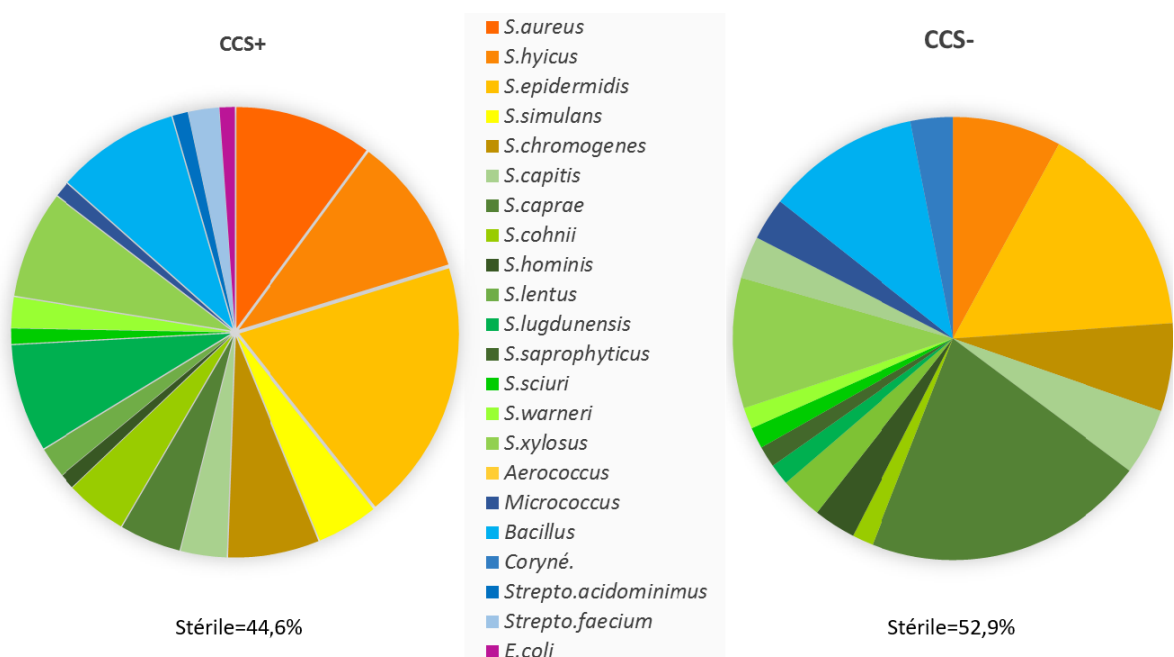


Figure 13 : Prévalence des différentes espèces bactériennes en fonction de la lignée

Dans la lignée CCS+ 44,6% des échantillons étaient stériles, contre 52,9% dans la lignée CCS-, ce qui représente une différence significative en acceptant une probabilité d'erreur de 10%. Parmi les échantillons ayant conduit à un isolement, les bactéries Gram-positives dominent largement, représentant 99,4% des prélèvements. Effectivement seul un isolement d'une bactérie Gram-négative a été réalisé et il s'agissait d'*Escherichia Coli* chez une chèvre de la lignée CCS+ (Figure 13).

Au sein des bactéries Gram-positives, les staphylocoques représentent 80,2% des isolats totaux. Les Staphylocoques à Coagulase Positive (SCP), *S. aureus* et *S. hyicus* sont significativement plus souvent isolés dans le lait des chèvres de la lignée CCS+, d'après un

test de Fisher (dans 10,8% des échantillons issus de chèvres CCS+ contre 3,6% de ceux issus de chèvres CCS-).

Les Staphylocoques à Coagulase Négative (SCN), sont les plus représentés, à hauteur de 65,6% des isolats bactériens. D'après la bibliographie, on peut distinguer les SCN hautement pathogènes, tels que *S. epidermidis*, *S. simulans* et *S. chromogenes* et des SCN mineurs. (59, 82, 94, 95) Les SCN hautement pathogènes sont significativement plus fréquemment isolés dans la lignée CCS+, d'après un test de Fisher (dans 21,0% des échantillons issus de chèvres CCS+ contre 10,1% de ceux issus de chèvres CCS-). Les SCN mineurs représentent quant à eux 39,5% des isolats totaux et sont moins fréquemment mis en évidence dans la lignée CCS+ (dans 18,7% des échantillons issus de chèvres CCS+ contre 22,5% de ceux issus de chèvres CCS-). (Annexe 16)

Les autres bactéries Gram-positives isolées sont des streptocoques, *S. acidominimus* et *S. faecium*, que l'on retrouve uniquement chez les chèvres de la lignée CCS+, dans 1,8% des échantillons de cette lignée. *Bacillus*, *Aerococcus* et *Corynebacterium* ont aussi été isolés dans 4,8% des échantillons de chèvres CCS+ et 7,9% pour les chèvres CCS-. (Figure 13)

Enfin pour chaque échantillon, le nombre de colonies ayant poussé sur la gélose a été estimé, afin d'obtenir une estimation du nombre de bactéries présentes (Figure 14).

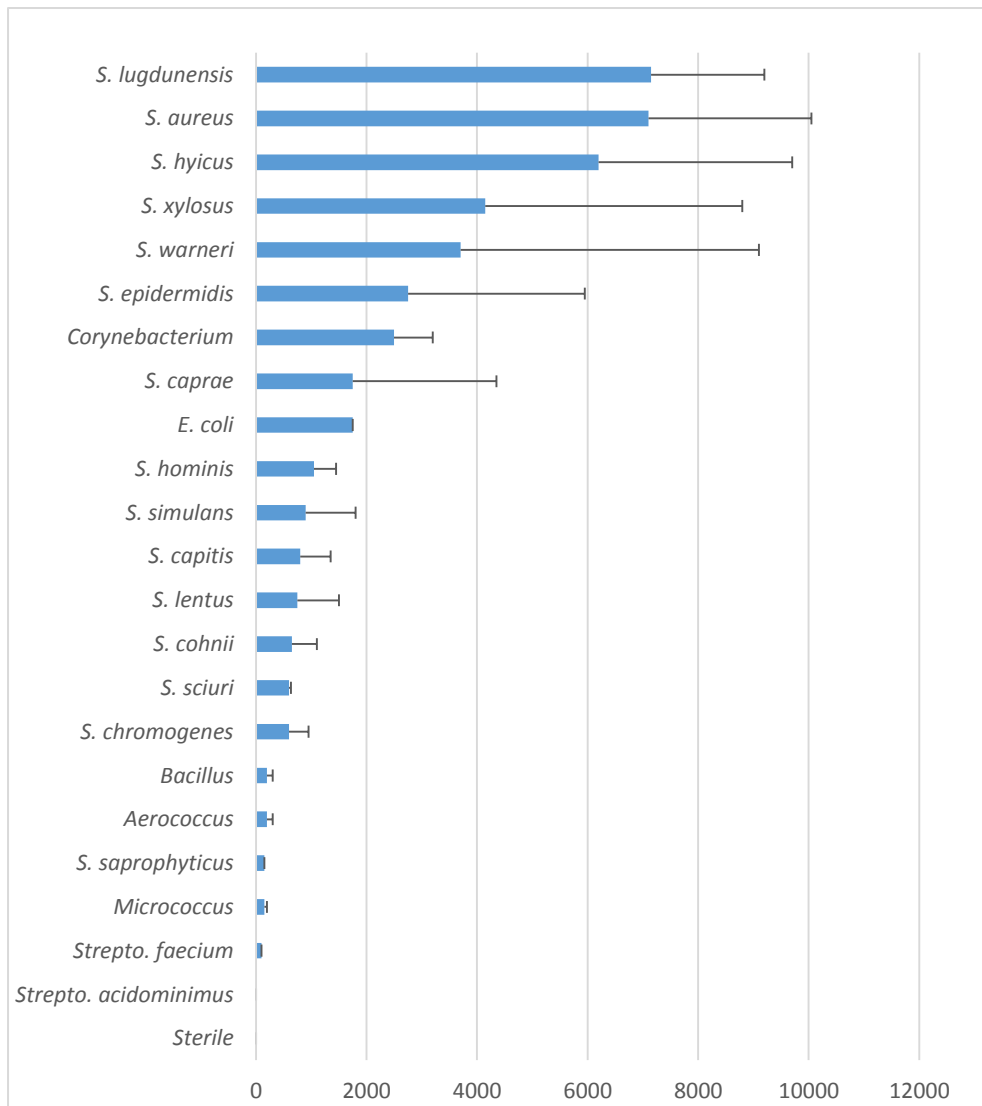


Figure 14 : Moyennes des mesures de la concentration des différentes espèces bactériennes isolées en bactériologie conventionnelle (en UFC/mL)

Les échantillons à partir desquels *S. lugdunensis*, *S. aureus* et *S. hyicus* ont été isolés, présentent un nombre moyen de colonies particulièrement élevé, allant de 7 150 UFC/mL à 6200 UFC/mL en moyenne. Cependant les écarts types sont très grands pour la majorité des espèces bactériennes.

2.5.1.2. Bactériologie moléculaire

La bactériologie conventionnelle a révélé que le genre *Staphylococcus* était considérablement plus représenté dans les isolats de lait de chèvre. Ainsi la bactériologie moléculaire a été utilisée ici pour dénombrer tous les staphylocoques présents dans les échantillons de lait. Le résultat a été exprimé en nombre d'équivalents génomes. Par cette méthode, seuls 46 échantillons sur 304 sont considérés comme stériles, ce qui représente 15%

des échantillons contre 48% en bactériologie conventionnelle. Pour les échantillons de la lignée CCS+, 25 prélèvements, soit 15,06 % des échantillons sont négatifs à la bactériologie moléculaire. Pour les échantillons de la lignée CCS-, 21 prélèvements, soit 15,22% des échantillons sont négatifs après analyse en bactériologie moléculaire. La proportion d'échantillons contenant des staphylocoques n'est pas significativement différente entre les lignées (test de Fisher).

On compte en moyenne 108.10^3 équivalents génomes /mL ($SD=399.10^3$) pour les chèvres de la lignée CCS- contre 537.10^3 équivalents génomes/mL ($SD=5\ 974.10^3$) pour les chèvres de la lignée CCS+. La comparaison des moyennes du nombre d'équivalents génomes entre les lignées indique que la différence n'est pas significative. Ces résultats sont surprenants par rapport aux études précédentes et aux résultats obtenus en bactériologie conventionnelle. Nous avons donc étudié la distribution de la charge bactérienne en fonction de la lignée (Figure 15).

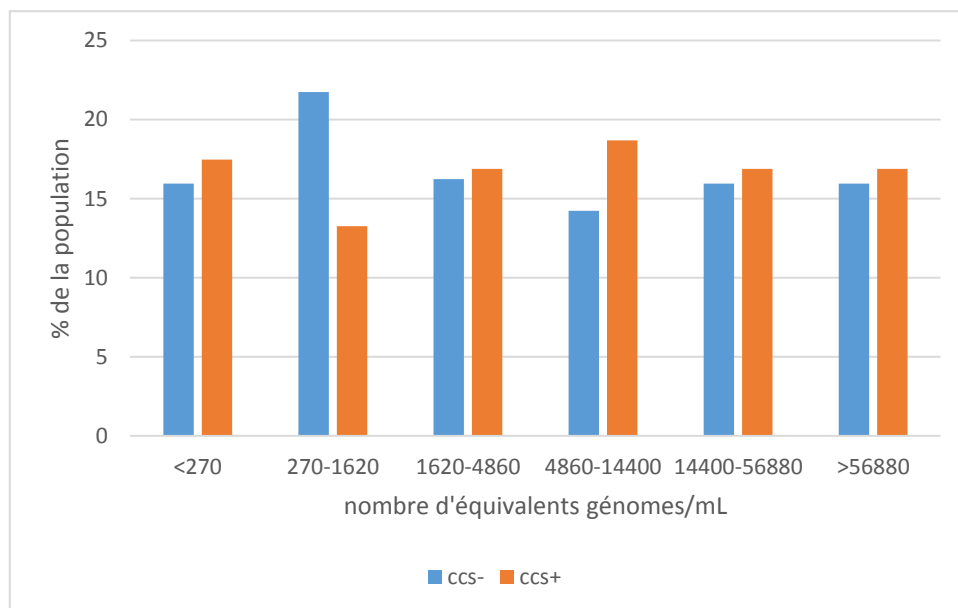


Figure 15 : Distribution de la charge bactérienne en staphylocoques mesurée en bactériologie moléculaire

Le nombre d'échantillons de la lignée CCS- est significativement plus grand pour des charges comprises entre 270 et 1 620 équivalents génomes/mL, alors que les échantillons de chèvres CCS+ sont plus nombreux dans les catégories contenant plus de 4 860 équivalents génomes/mL. Ainsi même si les moyennes des quantités de staphylocoques ne sont pas significativement différentes, la distribution des quantités entre échantillons n'est pas la même car les échantillons de chèvres CCS - sont nombreux à avoir un titre bactérien faible, et inversement pour les échantillons des chèvres CCS+.

2.5.2. Distinction selon le stade de lactation

2.5.2.1. **Bactériologie conventionnelle**

Les taux d'infection varient au cours de la lactation, en fonction de la pression d'infection bactérienne et de la réceptivité des chèvres.

Tableau IV : Taux d'infection détecté par la bactériologie conventionnelle selon la date de prélèvement

	26/03/2013	28/05/2013	24/09/2013
CCS-	65%	35%	41%
CCS+	65%	48%	52%

Entre le début et le milieu de la lactation, le taux d'infection déterminé par bactériologie conventionnelle, diminue significativement pour la lignée CCS- (Test de Fisher, $p= 0,0035$). Entre le milieu et la fin de la lactation, le taux d'infection augmente de manière non significative chez les deux lignées. Aucune différence entre les deux lignées n'est significative (Tableau IV).

Tableau V : Prévalence des différentes espèces bactériennes selon la date de prélèvement

	26/03/2013	28/05/2013	24/09/2013
<i>E. coli</i>	0	0	1
<i>Strepto. acidominimus</i>	1	0	0
<i>Strepto. faecium</i>	2	0	0
<i>S. aureus</i>	3	3	3
<i>S. hyicus</i>	5	4	5
<i>S. epidermidis</i>	8	11	8
<i>S. simulans</i>	1	2	1
<i>S. chromogenes</i>	4	4	2
<i>S. capitis</i>	5	1	0
<i>S. caprae</i>	9	5	3
<i>S. cohnii</i>	0	0	5
<i>S. hominis</i>	0	1	2
<i>S. lentus</i>	2	0	2
<i>S. lugdunensis</i>	2	2	4
<i>S. saprophyticus</i>	1	0	0
<i>S. sciuri</i>	0	0	2
<i>S. warneri</i>	0	0	3
<i>S. xylosus</i>	7	3	3
<i>Aerococcus</i>	1	1	0
<i>Micrococcus</i>	1	2	0
<i>Bacillus</i>	13	1	1
<i>Corynebacterium</i>	0	2	0
Stérile	37	59	51

La prévalence des infections est significativement plus grande au début de la lactation. Elle est prédominée par *Bacillus*, qui ne persiste dans aucune hémimamelle d'une date à l'autre. Les SCP ont tendance, quant à eux à persister du début à la fin de la lactation, sauf pour une hémimamelle dont le lait a permis l'isolement de *S. hyicus* en début de lactation, mais qui est négatif aux dates postérieures. Les SCN persistent dans certaines hémimamelles alors qu'ils sont éliminés dans d'autres. Il n'y a pas de différence significative concernant le taux d'infection entre le milieu et la fin de lactation (Tableau V). Afin de mieux visualiser les agents pathogènes persistants, nous avons identifié les hémimamelles où l'infection était persistante sur au moins 2 prélèvements consécutifs (Tableau VI).

Tableau VI : Agents pathogènes isolés sur au moins 2 prélèvements consécutifs sur une même hémimamelle et lignée de la chèvre correspondante

Agent pathogène	Lignée
Persistance aux 3 dates	
<i>S. aureus</i>	CCS+
<i>S. aureus</i>	CCS+
<i>S. aureus</i>	CCS+
<i>S. hyicus</i>	CCS+
<i>S. hyicus</i>	CCS+
<i>S. hyicus</i>	CCS+
<i>S. hyicus</i>	CCS-
<i>S. simulans</i>	CCS+
<i>S. epidermidis</i>	CCS+
<i>S. lugdunensis</i>	CCS+
<i>S. caprae</i>	CCS-
<i>S. xyloso</i>	CCS-
Persistance entre les 2 dernières dates	
<i>S. xyloso</i>	CCS+
<i>S. lugdunensis</i>	CCS+
<i>S. caprae</i>	CCS-
<i>S. epidermidis</i>	CCS-
<i>S. chromogenes</i>	CCS-
Persistance entre les 2 premières dates	
<i>S. epidermidis</i>	CCS+
<i>S. epidermidis</i>	CCS+
<i>S. caprae</i>	CCS-
<i>S. caprae</i>	CCS-

Les agents pathogènes qui persistent durant toute la lactation sont principalement des SCP. Concernant les autres agents pathogènes, les SCN hautement pathogènes sont majoritairement isolés. Les prélèvements où une bactérie persiste jusqu'à la fin de la lactation sont majoritairement issus de chèvres CCS+, avec 11 hémimamelles contre 6 pour la lignée CCS-. Autant de chèvres parviennent à éliminer l'agent pathogène entre le milieu et la fin de la lactation chez les CCS+ que chez les CCS-.

2.5.2.2. Bactériologie moléculaire

La concentration moyenne de génomes de staphylocoques en début de lactation est de 33.10^3 équivalents génomes /mL (SD= 110.10^3), elle n'est pas significativement différente de la moyenne en milieu de lactation qui est de 106.10^3 équivalents génomes /mL (SD= 492.10^3). La concentration moyenne en staphylocoques en fin de lactation est quant à elle très significativement supérieure, atteignant 937.10^3 équivalents génomes /mL (SD= 7846.10^3). En détaillant ces données en fonction de la lignée, nous obtenons les résultats suivants (Tableau VII).

Tableau VII : Quantité de staphylocoques détectés par mL (SD) et taux d'infection par bactériologie moléculaire selon la date de prélèvement

		26/03/2013	28/05/2013	24/09/2013
Moyenne d'équivalents génomes/mL	CCS-	38.10^3 (137.10^3)	110.10^3 (165.10^3)	186.10^3 (530.10^3)
	CCS+	28.10^3 (81.10^3)	103.10^3 (541.10^3)	1573.10^3 (106.10^6)
Taux d'infection	CCS-	82%	79%	92%
	CCS+	83%	80%	92%

Aucune différence significative n'est notée entre les lignées à chacune des dates. Au sein d'une lignée donnée, la seule différence significative concerne la lignée CCS+ pour l'augmentation de la concentration bactérienne moyenne entre le milieu et la fin de la lactation.

2.5.3. Comparaison des résultats obtenus avec les deux méthodes

Les deux méthodes de bactériologie semblent donner des résultats contradictoires sur plusieurs points. Il semble donc important de les comparer, afin d'interpréter correctement ces différences.

De nombreux prélèvements sont négatifs ou très faiblement positifs à la bactériologie conventionnelle, alors qu'ils sont positifs voire très positifs à la bactériologie moléculaire (Annexe 17). Les concentrations bactériennes atteignent 10^4 UFC/mL avec une moyenne de 380 UFC/mL en bactériologie conventionnelle, contre un maximum de 77.10^6 équivalents génomes/mL et une moyenne de 112.10^4 équivalents génomes/mL en bactériologie moléculaire. La bactériologie moléculaire détecte donc une plus grande quantité de staphylocoques dans les échantillons de lait et elle est beaucoup plus sensible ; mais la corrélation entre les deux méthodes de 0,62 est relativement bonne.

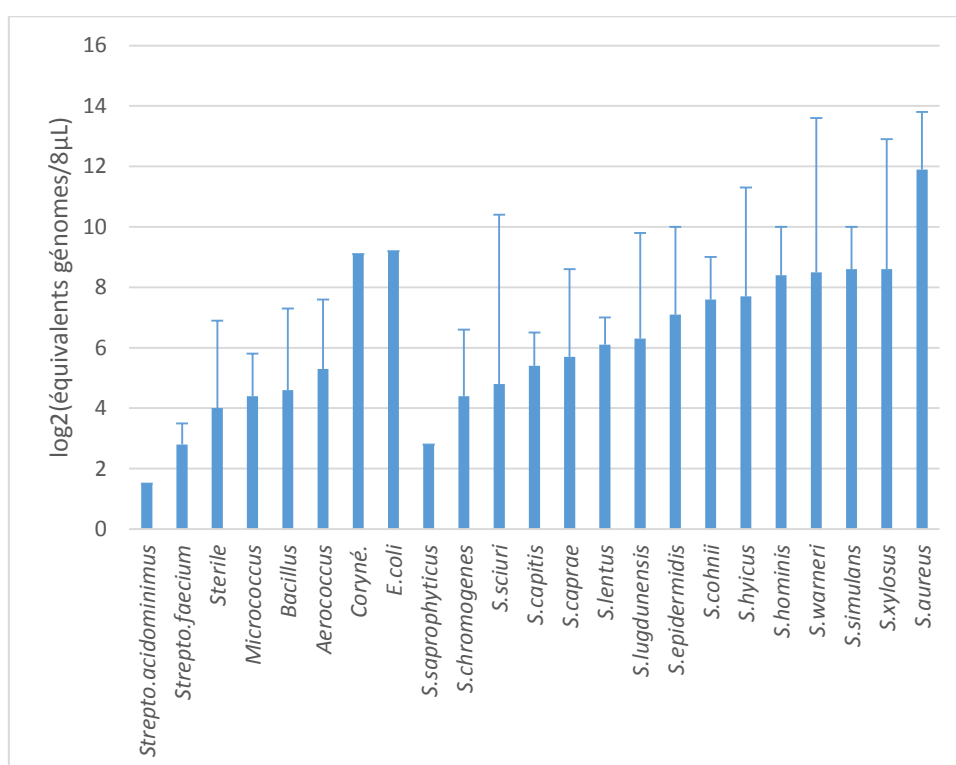


Figure 16 : Dénombrement des staphylocoques (en logarithme binaire d'équivalents génomes) par la technique de bactériologie moléculaire en fonction du type de bactérie identifié en bactériologie conventionnelle

Un certain nombre de prélèvements dans lesquels aucun staphylocoque n'a été isolé en bactériologie conventionnelle contiennent une grande quantité de génomes de staphylocoques

à l'analyse moléculaire (Figure 16). Le nombre d'équivalents génomes est particulièrement élevé pour les échantillons où *E. coli* et *Corynebacterium* étaient considérés comme l'espèce dominante à la bactériologie conventionnelle. Concernant les échantillons où un staphylocoque avait été isolé à la bactériologie conventionnelle, *S. aureus* est associé à une plus grande quantité de génomes bactériens, suivi de *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. hominis* et *S. hyicus*.

2.6. Facteurs liés à l'agent pathogène influençant le profil cellulaire

Nous avons vu que les facteurs liés à l'animal influençaient significativement le profil cellulaire. Cependant il reste de grosses variations au sein même des catégories précédemment établies. En effet, la nature de la bactérie identifiée dans l'échantillon de lait mais aussi sa quantité influence le profil cellulaire (Figure 18). Afin de détailler ce facteur, nous avons étudié l'influence de l'espèce de bactérie, grâce à la bactériologie conventionnelle ; mais aussi du nombre de bactéries, grâce à la bactériologie moléculaire (qPCR), lorsqu'il s'agissait d'un staphylocoque.

2.6.1. Effet de l'espèce bactérienne

Selon l'espèce bactérienne déterminée par bactériologie conventionnelle, la réponse inflammatoire mammaire semble plus ou moins forte.

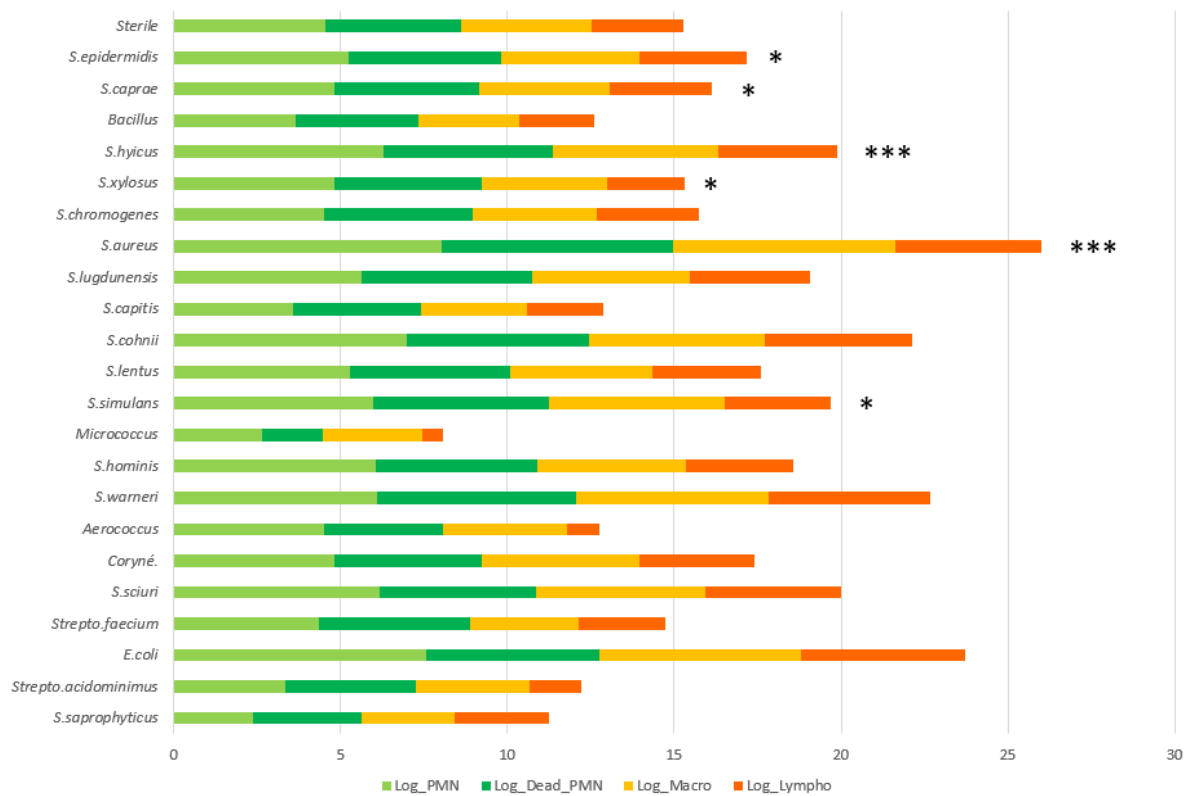


Figure 17 : Effet de l'espèce bactérienne sur la CCS
 *** $P < 0,0001$ * $P < 0,05$

Les espèces bactériennes sont rangées par ordre de fréquence décroissante. On remarque que selon l'espèce, la cellularité du lait est très variable à la fois par sa composition et par la CCS. Un test de significativité a été effectué sur la SCS. Celui-ci a mis en évidence que deux des espèces bactériennes isolées engendraient dans cette étude une concentration cellulaire très significativement plus grande dans les échantillons à partir desquels elles sont isolées. Il s'agit de *S. aureus* et *S. hyicus*. Dans le reste de l'étude nous les considérerons donc comme des agents pathogènes majeurs. De plus, quatre espèces bactériennes, ont été reliées à des CCS significativement plus élevées. Il s'agit des espèces *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. simulans*, et *S. xylosus*.

2.6.2. Effet du nombre de bactéries

La corrélation entre le nombre de cellules présentes dans le lait et le nombre de bactéries dénombrées a été comparée selon la technique de bactériologie utilisée.

Tableau VIII : Corrélation entre les nombres de cellules de chaque type et le nombre de bactéries dénombrées par mL par les deux techniques de bactériologie

CORRLATION	Nombre de colonies (bactériologie conventionnelle)	Log2(Nombre d'équivalents génomes) (bactériologie moléculaire)
SCS	0,47915	0,51214
Logarithme de PMN	0,49286	0,51176
Logarithme de PMN morts	0,38145	0,41738
Logarithme de macrophages	0,43875	0,46036
Logarithme de lymphocytes	0,29636	0,29244

Pour toutes les valeurs $p < 0,0001$

La corrélation entre le nombre de cellules présentes dans le lait et le nombre de bactéries dénombrées est meilleure avec le dénombrement en bactériologie moléculaire, pour tous les types cellulaires, sauf pour les lymphocytes. Quelle que soit la technique utilisée, la corrélation la plus élevée est obtenue pour les PMN, suivie des macrophages, puis des PMN morts. La corrélation pour les lymphocytes est beaucoup moins bonne (Tableau VIII).

2.6.3. Effet croisé de l'espèce et du nombre de bactéries

Nous avons vu qu'à la fois l'espèce et le nombre de bactéries pouvaient avoir un effet sur le profil cellulaire. Ainsi afin d'objectiver leurs effets, nous avons déterminé quatre catégories d'échantillons (Figure 18). Ces catégories sont fondées sur le type de bactérie identifié par la bactériologie conventionnelle et le nombre de bactéries déterminé par la bactériologie moléculaire, dont nous avons montré qu'elle est plus sensible. Plusieurs modèles, avec des catégories constituées de façons différentes ont été analysés. La performance du nouveau modèle par rapport à l'ancien a été évaluée au moyen du Critère d'Information d'Akaike (AIC). Le modèle retenu est celui qui possède l'AIC le plus faible, soit celui qui offre le meilleur équilibre entre l'ajustement aux données et la complexité du modèle.

La catégorie 4 correspond aux échantillons dans lesquels un germe « majeur » a été isolé à la bactériologie conventionnelle. La catégorie 3 regroupe les échantillons contenant un

germe mineur (autre que *S. aureus* ou *S. hyicus*) dans lesquels le titre bactérien est supérieur à 11 520 équivalents génomes/mL comme déterminé par qPCR. La catégorie 2 correspond aux échantillons contenant un germe mineur, dans lesquels le titre bactérien est compris entre 1440 et 11 520 équivalents génomes/mL à la qPCR. Enfin la catégorie 1 est composée d'échantillons dits « stériles » à la bactériologie conventionnelle ou comptant moins de 1 440 équivalents génomes bactériens/mL par la qPCR. Ces catégories étaient celles qui étaient le mieux corrélées au SCS, par rapport à tous les autres modèles testés. Chaque catégorie compte respectivement 88, 93, 100 et 23 échantillons.

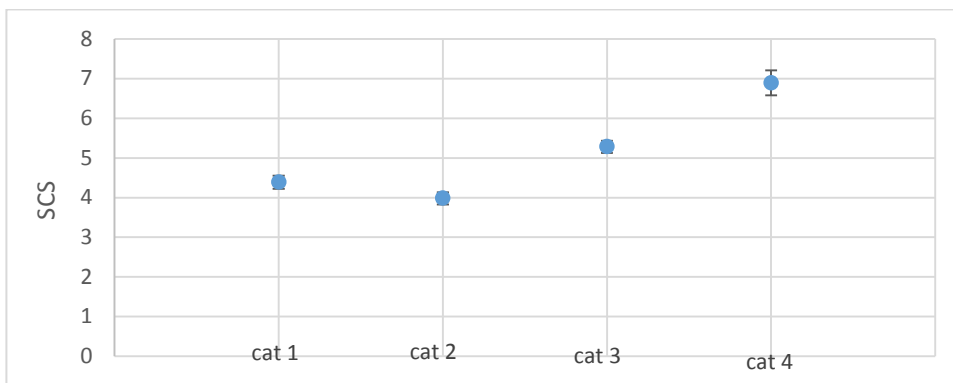


Figure 18 : SCS en fonction de la catégorie d'agent infectieux

A partir de ces catégories, les concentrations de PMN, PMN morts macrophages et lymphocytes ont donc été étudiées (Figure 19).

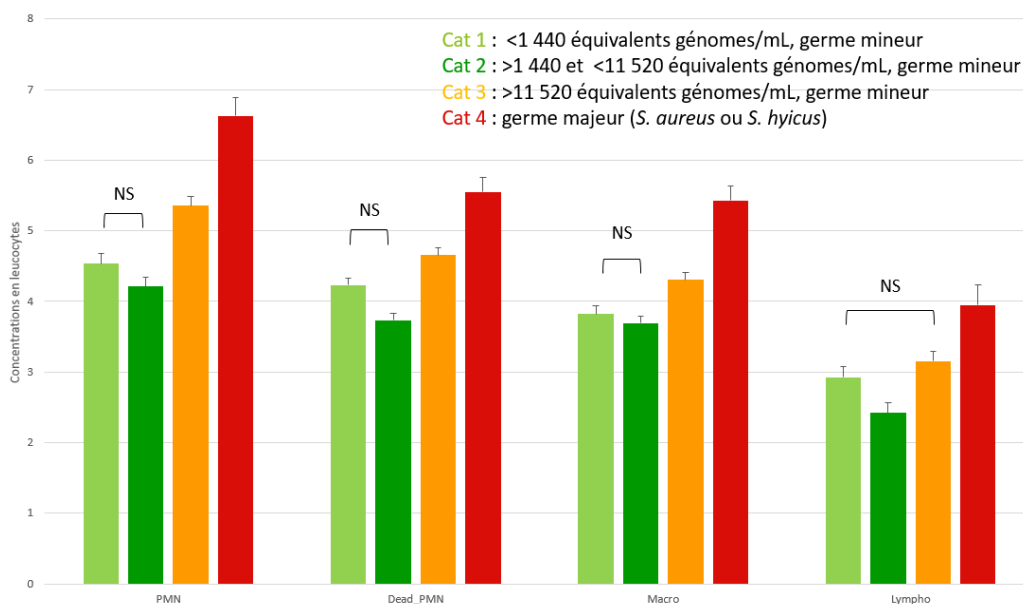


Figure 19 : Décompte de chaque type cellulaire en fonction de l'espèce de bactérie et de sa quantité
Tous les écarts entre les catégories étaient significatifs, $p < 0,05$, sauf ceux notés NS

Quel que soit le type cellulaire, la quantité de cellules par unité volumique augmente entre les catégories 2 à 4 (Annexe 18). Entre la catégorie 1 et la catégorie 2, une différence à la baisse des cellules est observée. Cependant cette différence n'est pas significative sauf pour les lymphocytes (Figure 19).

2.6.4. Effet de l'agent pathogène en fonction de la lignée

Afin d'étudier les différences de réponse immunitaire locale, pour une infection identique ou semblable entre les lignées, six catégories ont été définies. D'après la Figure 19, la différence est peu marquée voire absente entre des échantillons contenant un germe mineur avec un titre bactérien faible ou moyen. Aussi, ces deux sous-catégories ont été groupées. Les catégories 1 et 2, regroupent les 2 sous-catégories de la Figure 19 citées précédemment, et sont donc composées des échantillons à germes dits « mineurs » à la bactériologie conventionnelle et comptant moins de 11 520 équivalents génomes bactériens/mL en qPCR. Le statut infectieux sera alors dit « faible » et la catégorie 1, sera composée d'échantillons de la lignée CCS- et la catégorie 2 de la lignée CCS+. Les catégories 3 et 4, respectivement pour la lignée CCS- et CCS+, sont composées des échantillons à germe « mineur » à la bactériologie conventionnelle et comptant plus de 11 520 équivalents génomes bactériens/ mL à la qPCR. Le statut infectieux sera dit « intermédiaire ». Enfin les catégories 5 et 6 correspondent aux échantillons dans lesquels un germe « majeur » a été isolé à la bactériologie conventionnelle, respectivement pour la lignée CCS- et la lignée CCS+. Le statut infectieux sera dit « fort ». Les effectifs de chaque catégorie sont respectivement de 90, 91, 43, 57, 5 et 18 échantillons (Figure 21).

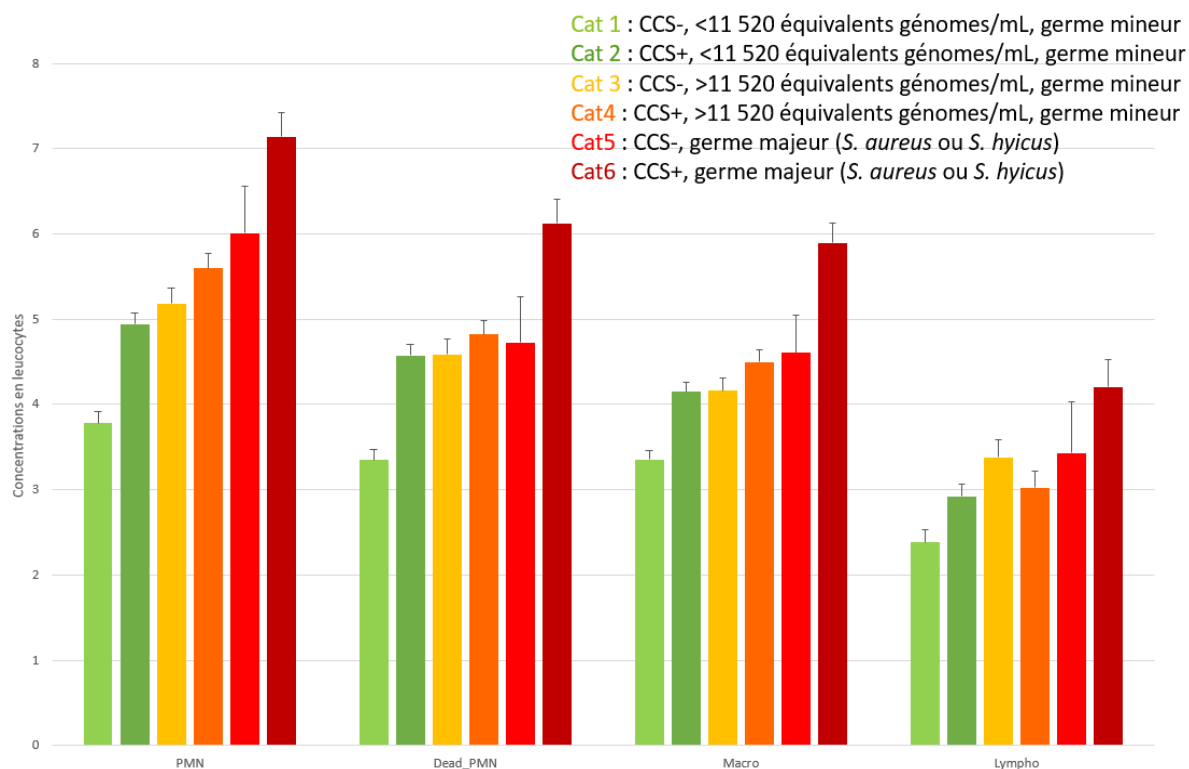


Figure 20 : Dénombrement des différents types de leucocytes en fonction du statut infectieux et de la lignée

Tableau IX : Significativité de différences entre certaines catégories de la Figure 20
(Liste complète en Annexe 19)

	PMN	Dead_PMN	Macro	Lympho
Cat1-2	***	***	***	**
Cat1-3	***	***	***	***
Cat2-4	**	NS	*	NS
Cat3-4	NS	NS	NS	NS
Cat3-5	NS	NS	NS	NS
Cat4-6	***	***	***	*
Cat5-6	NS	*	**	NS
Cat2-3	NS	NS	NS	NS

*** $P < 0,0001$ ** $P < 0,001$ * $P < 0,05$ NS = « non significatif » = $P > 0,05$

Les chèvres de la lignée CCS+ ont des concentrations de PMN, PMN morts et de macrophages plus grandes, à statut infectieux égal. A statut infectieux défini comme faible,

c'est-à-dire pour un agent pathogène autre que *S. aureus* ou *S. hyicus* et un titre bactérien inférieur à 1440 UFC/mL par la qPCR, les échantillons issus des chèvres CCS- ont des concentrations cellulaires plus faibles pour tous les types de leucocytes. Au statut infectieux « intermédiaire », cette différence n'est significative que pour les PMN et les macrophages. Pour un statut infectieux « fort », la différence est significative uniquement pour les macrophages. Pour ces trois types cellulaires, on observe une augmentation du nombre de cellules entre statut infectieux « faible » et « intermédiaire », qui est très significative dans la lignée CCS- et peu ou pas significative dans la lignée CCS+. Par ailleurs, les concentrations cellulaires entre les échantillons de chèvres CCS+ à statut infectieux « faible » et les CCS- à statut infectieux « intermédiaire » ne présentent pas de différence significative pour tous les types cellulaires analysés. Enfin on note une augmentation très significative du nombre de PMN, PMN morts et macrophages pour la lignée CCS+ entre le statut « intermédiaire » et le statut « fort », ce qui n'est pas le cas pour la lignée CCS- (Tableau IX).

Concernant les lymphocytes, leur dénombrement est significativement plus faible dans les échantillons de la lignée CCS- pour un statut infectieux de la catégorie « faible ». Cependant, on observe une augmentation très significative entre les concentrations de statut infectieux « faible » et « intermédiaire » pour la lignée CCS-, alors qu'il n'y a pas d'augmentation significative pour la lignée CCS+ entre ces catégories. On ne note pas de différence significative entre les lignées CCS+ et CCS- pour un statut infectieux « intermédiaire » et « fort », bien que l'augmentation du nombre de lymphocytes par millilitre soit significative entre ces 2 catégories uniquement pour la lignée CCS+.

2.7. Facteurs influençant les paramètres de production

Les paramètres de production du lait peuvent, tout comme les concentrations cellulaires, être influencés par des facteurs propres à l'animal ou en lien avec la présence d'un agent infectieux. Les paramètres étudiés sont ceux relevés au contrôle laitier, c'est-à-dire la quantité de lait, le taux butyreux (TB) et le taux protéique (TP). Ces mesures ne sont disponibles qu'à l'échelle de l'animal (lait de traite) et non pas par hémimamelle.

2.7.1. Les facteurs liés à l'animal

Les facteurs étudiés ici sont la lignée, le stade de lactation et le rang de lactation (Tableau X).

Tableau X : Significativité des effets liés à l'animal sur les paramètres de production

	Lignée	Date	N° de lactation
Quantité de lait	** P = 0,0028	*** P < 0,0001	NS
TB	NS	*** P < 0,0001	NS
TP	*** P < 0,0001	*** P < 0,0001	* P=0,0113

*** $P < 0,0001$ ** $P < 0,001$ * $P < 0,05$ NS = « non significatif » = $P > 0,05$

Le stade de lactation a un effet très significatif sur tous les paramètres du contrôle laitier étudiés ici. En effet la quantité de lait produite diminue très significativement à chaque date passant d'une moyenne de 1 997 mL (SD=41mL) par traite en début de lactation à 958 mL (SD=42mL) par traite en fin de lactation. Concernant le TB, il augmente très significativement entre le début et le milieu de la lactation passant d'une moyenne de 28,6 g/L (SD=1,2) à 43,2 g/L (SD=1,2), pour diminuer très significativement en fin de lactation à 34,7 g/L (SD=1,3). Enfin le TP diminue très significativement entre le début et le milieu de la lactation passant d'une moyenne de 31,8 g/L (SD=3) à 30,0 g/L (SD=3). Il augmente très significativement en fin de lactation jusqu'à 34,0 g/L (SD=3).

La lignée a un effet significatif sur la quantité de lait. Les chèvres de la lignée CCS+ produisent significativement plus de lait en moyenne que les chèvres de la lignée CCS- (1590 mL/traite (SD=32) contre 1 449 mL/traite (SD=35)). De plus, elle a un effet très significatif sur le TP. Effectivement, les chèvres de la lignée CCS+ ont un TP significativement plus bas (31,2 g/L (SD=2) contre 32,6 g/L (SD=2)).

Le rang de lactation a un effet significatif uniquement sur le TP. Les primipares ont un TP significativement plus bas que les chèvres en 2^{ème} lactation (31,5g/L (SD=2) contre 32,4g/L (SD=2)).

2.7.2. Les facteurs liés à l'agent infectieux

Les catégories mises en place pour la Figure 19 ont été reprises ici. Aucun effet significatif de l'agent infectieux n'est observé sur la quantité de lait produite et le TB, contrairement au TP.

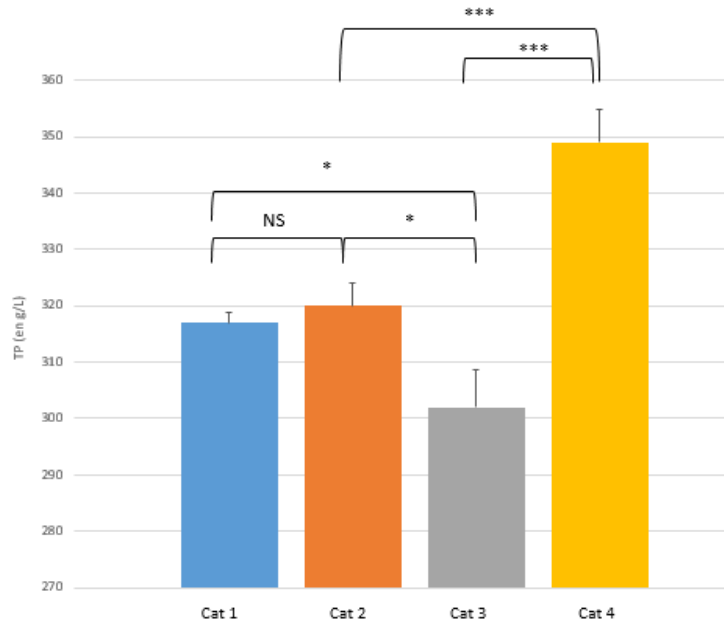


Figure 21 : Variation du taux protéique selon la catégorie d'agent bactérien

*** $P < 0.0001$ * $P < 0.05$ NS = « non significatif » = $P > 0.05$

Concernant le TP, une augmentation très significative est observée lors d'infection par un agent bactérien « majeur », alors qu'une baisse significative apparaît dans les échantillons contenant un agent pathogène « mineur » en grande quantité.

3. DISCUSSION

3.1. Distribution des types cellulaires dans le lait de chèvre

La CCS est le critère le plus étudié et le plus utilisé pour qualifier la santé mammaire des ruminants laitiers, les caprins compris. Dans cette étude la valeur moyenne de la CCS était de $1\ 035.10^3$ cellules/mL (SD= $2\ 683.10^3$) sur l'ensemble des échantillons. La valeur de la CCS moyenne était différente en fonction du statut infectieux de l'hémi-mamelle : 696.10^3 cellules/mL (SD= $1\ 320.10^3$) pour les échantillons dont l'isolement était négatif et $1\ 365.10^3$ cellules/mL (SD= $3\ 512.10^3$) pour les échantillons dont la bactériologie conventionnelle était positive. Ces moyennes cellulaires sont très élevées par rapport aux moyennes habituellement enregistrées dans d'autres études, particulièrement pour le groupe dont la bactériologie est négative (99). Ceci peut refléter un défaut de maîtrise des infections mammaires en relation avec une mauvaise hygiène, en particulier de la traite ; cela est cohérent avec l'absence de mesures de pré et post trempage. Une infection par le CAEV pourrait aussi induire une augmentation de la quantité de leucocytes dans le lait (169). Concernant la différence entre les deux lignées divergentes, sélectionnées sur le critère de la CCS, la différence est significative avec une moyenne de 830.10^3 cellules/mL (SD= $3\ 109.10^3$) pour la lignée CCS- et $1\ 210.10^3$ cellules/mL (SD= $2\ 253.10^3$) pour la lignée CCS+. Ces résultats confirment ceux obtenus les années précédentes sur des chèvres de ce schéma de sélection (20).

La particularité de cette étude était de décomposer la CCS en fonction des types de cellules nucléées retrouvées dans le lait, grâce à l'analyse en cytométrie de flux (FACS). Il s'agit essentiellement des cellules de la réponse inflammatoire. Dans cette analyse, les neutrophiles (ou PMN), les lymphocytes, les macrophages et les PMN morts étaient ainsi dénombrés. Contrairement à d'autres études (157), les éosinophiles n'ont pas été comptabilisés. En effet, le pourcentage d'éosinophiles dans le lait est normalement faible et biologiquement insignifiant. Il peut cependant augmenter lors d'infestation parasitaire marquée, car une partie des éosinophiles sanguins passent dans le lait. Dans notre étude, la conduite d'élevage étant exclusivement en bâtiment, et la dernière coprologie réalisée indiquant un parasitisme gastro-intestinal faible à inexistant, cette variable n'est pas indispensable. Par ailleurs, la présence en quantité anormalement élevée d'éosinophiles aurait été repérée sur les graphiques d'analyse des données de cytométrie, ce qui ne fut pas le cas.

Les données CCS étant disponibles en routine car acquises à l'occasion des mesures associées au contrôle laitier, et moins onéreuses à obtenir que les données de cytométrie, l'existence d'une relation directe entre la concentration des différents types cellulaires et la CCS a été recherchée. En effet, chez la vache, une bonne corrélation entre la CCS et le pourcentage de PMN ainsi qu'avec celui des lymphocytes a été mise en évidence (145) (Annexes 9 et 10). Dans notre étude, l'augmentation de la CCS et l'augmentation de la concentration de PMN sont bien corrélées (Figure 10). Cependant, la relation est moins bien établie entre la CCS et la concentration de macrophages et de PMN morts (Annexe 12), et encore moins avec celle des lymphocytes (Figure 11). Ainsi les corrélations obtenues chez la chèvre sont moins bonnes que celles établies chez la vache. Dans l'espèce caprine, les PMN prédominent sur les autres leucocytes, quel que soit la CCS, alors que dans l'espèce bovine ce n'est la cas que pour les laits ayant des CCS élevées (145). Cette différence est peut-être liée au statut infectieux des animaux qui est globalement défavorable. La grande fréquence des infections mammaires et la forte proportion de mamelles avec une inflammation chronique pourrait expliquer ce résultat.

Dans notre étude, quels que soient le statut infectieux et la lignée, les cellules somatiques sont majoritairement composées de PMN (43.6% des cellules somatiques en moyenne), puis viennent les PMN morts (27.0%), suivis par les macrophages (20.1%) et enfin les lymphocytes (9.3%). Les proportions des différents types cellulaires sont en accord avec la majorité des études réalisées chez la chèvre même s'il existe une très grande variabilité de résultats (42, 117, 128, 157). Ici, les concentrations des différents types de cellules sont différentes selon la lignée considérée et le statut bactériologique de leurs mamelles (Figure 9). Il existe cependant, au sein d'une même catégorie, une grande variabilité inter-individuelle. C'est pourquoi nous avons choisi de nous intéresser aux facteurs liés à l'animal puis à l'agent infectieux, pouvant influencer le profil cellulaire du lait dans cette espèce.

3.2 Influence des caractéristiques liées à l'animal sur le profil cellulaire

3.2.1. Effet lignée

Les lignées de chèvres étudiées ont été conçues en utilisant le critère de la CCS pour la sélection génétique des parents. Ainsi il n'est pas surprenant que leurs CCS moyennes soient significativement différentes. La sélection sur ce critère est donc efficace et permet de créer

des animaux aux statuts mammaires significativement différents. Dans cette étude, l'effet lignée est très significatif sur la concentration des PMN, qu'ils soient vivants ou morts, et les macrophages. Il est également significatif sur la concentration des lymphocytes (Tableau II). Les concentrations de tous les types cellulaires sont augmentées dans les échantillons de lait de chèvres CCS+ (Annexe 13). Cependant, la question qui se pose ici est de savoir si les chèvres de la lignée CCS- ont des concentrations de cellules du lait moindres car leur réaction immunitaire est plus efficace ou si cela est dû à une différence du taux d'infection qui est moindre par rapport à la lignée CCS+.

Tout d'abord, le profil cellulaire, déterminé par la cytométrie en flux, est significativement différent entre les deux lignées (Figure 8). Le pourcentage moyen de l'ensemble des PMN est plus élevé chez les chèvres de lignée CCS+, cette différence étant significative pour les PMN vivants. Sachant que le pourcentage de PMN augmente significativement en cas d'infection (136, 157, 170), une proportion et une concentration plus grandes de neutrophiles pourraient simplement signer un taux d'infection plus grand des chèvres CCS+. Cependant, ce que montre notre étude, c'est qu'à statut infectieux identique en bactériologie conventionnelle, la concentration de PMN est beaucoup plus grande chez les chèvres CCS+ (Figure 9). Une concentration de PMN plus élevée dans les échantillons de lait sans isolement pourrait donc être expliquée par un recrutement basal plus marqué chez les chèvres de la lignée CCS+. Une persistance du recrutement des neutrophiles, et donc de l'inflammation mammaire, suite à une infection antérieure pourrait aussi expliquer cette observation.

La présence de PMN est aussi plus marquée, chez les chèvres CCS+ à statut bactériologique positif en bactériologie conventionnelle (Figure 2). Elle peut être due à une réponse exacerbée vis-à-vis de l'infection, et donc un recrutement plus marqué à infection égale. Une quantité de bactéries plus grande pourrait expliquer la concentration plus élevée de cellules, particulièrement si les neutrophiles de la lignée CCS+ étaient moins efficaces que ceux de la lignée CCS-, comme cela a été suspecté chez des brebis d'une sélection divergente (22). En effet, si tel est le cas, cela permettrait alors une plus grande multiplication des bactéries et en conséquence, nécessiterait un recrutement plus marqué des PMN pour juguler l'infection. De plus, le fait que la concentration des PMN morts soit significativement plus grande chez les chèvres de la lignée CCS+, pourrait soutenir l'hypothèse de neutrophiles moins efficaces car plus sensibles à l'apoptose ou la nécrose associées au processus infectieux. Or une moindre efficacité de la réponse neutrophilique, avec une tendance

apoptotique plus marquée, peut venir d'un milieu cytokinique défavorable à leur survie (171), voire d'une déficience génétique pour la survie des neutrophiles au cours de la réponse infectieuse.

A l'inverse, le pourcentage moyen de macrophages est significativement supérieur chez les chèvres CCS-, tout comme celui des lymphocytes pour lequel la différence est même très significative. Ces différences restent toutefois relatives avec le pourcentage de PMN. Ainsi on peut simplement en déduire que la part des macrophages et surtout des lymphocytes est plus grande dans la lignée CCS-. Une analyse fine reposant sur les concentrations cellulaires est nécessaire pour formuler des hypothèses.

De plus, la distinction entre « statut bactériologique positif » et « statut bactériologique négatif » à partir de l'analyse en bactériologie conventionnelle est souvent utilisée dans les études (42, 157), mais n'apporte ni un aspect quantitatif, ni un aspect qualitatif avec l'identification de l'espèce bactérienne en jeu. Dans la suite de l'étude, les résultats de la bactériologie conventionnelle et de la bactériologie moléculaire seront donc combinés, afin d'affiner le statut bactériologique des héli-mamelles. Avant d'étudier l'impact des infections bactériennes, il est toutefois important d'identifier les autres effets indépendants de l'infection pouvant avoir un impact sur les concentrations cellulaires, afin de les prendre en compte dans nos modèles statistiques.

3.2.2. Autres effets liés à l'animal

Le stade de lactation est le facteur ayant le plus d'effet sur la concentration des cellules du lait quel que soit le type de leucocyte considéré (Tableau 4). Les concentrations de tous les leucocytes sont très significativement augmentés en fin de lactation, tout comme dans les études précédentes (93, 117, 172), même lorsque l'on s'affranchit de l'effet de concentration, à cause de la diminution du volume de lait produit (Annexe 14). Cela peut s'expliquer par une prévalence d'infections plus grande en fin de lactation, dû à de nouvelles infections ou bien à un effet cumulatif des infections acquises durant la lactation et qui persistent pendant de longues périodes. Des études ont aussi montré que l'augmentation de l'élimination de PMN dans le lait en fin de lactation était très significative même chez les chèvres supposées non infectées d'après les résultats de la bactériologie conventionnelle (144, 173). Cela serait dû à des facteurs chimiotactiques différents de ceux qui apparaissent lors d'une inflammation, provoquant un afflux de PMN ; ces cellules interviendraient possiblement dans l'involution de

la glande mammaire en fin de lactation (173). L'importance de ce mécanisme et son fonctionnement ne sont toutefois pas complètement connus. De plus, dans notre étude, il faut noter que les mises bas s'étalant sur 2 mois, et les prélèvements étant réalisés aux mêmes dates pour toutes les chèvres, il existait une différence du stade de lactation au moment des prélèvements entre les chèvres ayant mis bas début janvier et celles ayant mis bas en mars. Ainsi, pour être plus rigoureux du point de vue expérimental, il aurait fallu mieux grouper les inséminations afin d'éviter ce biais ou prendre en compte la durée de lactation individuelle dans l'analyse statistique.

L'effet du rang de lactation a été bien décrit dans la littérature que ce soit chez la vache ou chez les petits ruminants (97, 117, 144, 157, 158). Une augmentation des CCS en relation avec la parité est rapportée chez la chèvre, ce qui est accentué par le faible taux de guérison spontanée durant la période sèche qui est compris entre 20 et 60% (1, 84, 174). A la persistance des infections, il faut ajouter un taux de nouvelles infections pendant la période sèche de l'ordre de 7,5% (97). Dans notre étude, le rang de lactation n'a un effet significatif que sur la concentration en lymphocytes, qui augmente pour les chèvres en 2^{ème} lactation (Tableau II). Un effet mémoire pourrait expliquer cette augmentation spécifique du nombre de lymphocytes. En effet, les chèvres ayant été en contact avec un agent pathogène en première lactation pourraient développer une immunité adaptative et produire des lymphocytes T mémoires qui persistent dans le lait. Chez la vache, il a été montré que les lymphocytes présents dans le lait étaient majoritairement des lymphocytes T mémoires (138), ce qui est compatible avec cette hypothèse. Une autre hypothèse reste une prévalence élevée du CAEV dans le troupeau. En effet, il a été montré chez la brebis qu'une infection par le virus Visna-Maedi provoquait une augmentation significative du taux de lymphocytes dans le lait (169). Le CAEV est un lentivirus tout comme le Visna-Maedi et ces deux virus ayant une biologie et des mécanismes d'action très proches, on peut donc s'attendre à ce que l'infection par le CAEV provoque une augmentation du nombre de lymphocytes dans le lait. Or l'effet de l'âge étant plus significatif que l'effet du rang de lactation sur la concentration des lymphocytes, nous avons une préférence pour cette seconde hypothèse. Cependant, une étude a montré que 15% des chèvres testées directement après la première mise bas avaient une héli-mamelle infectée par une bactérie (97) ; ces infections précoces seraient peut être suffisantes pour initier une réponse vis-à-vis de ces agents. Il faudrait donc connaître le statut de chaque chèvre vis-à-vis du CAEV à l'U.E. de Bourges pour évaluer cette hypothèse. Seules quelques

analyses individuelles ont été effectuées ; certaines étaient positives, indiquant que le CAEV est présent dans ce troupeau.

Enfin, l'effet côté de l'hémi-mamelle était significatif sur la concentration des neutrophiles vivants. En effet, cette dernière était plus élevée dans les échantillons collectés à partir des hémimamelles gauches (Tableau II). En parallèle, aucune différence du statut bactériologique n'a été constatée, que ce soit en bactériologie conventionnelle ou moléculaire. Les hypothèses concernant cette inflammation dissymétrique sans infection pourraient être liées au décubitus plus fréquent sur le flanc gauche, ce qui n'a pas jamais été observé, ou bien en relation avec la technique de traite plus agressive pour l'hémimamelle gauche. Dans une étude sur 305 chèvres, une différence significative de la CCS avait été montrée, mais avec une augmentation à droite (158), ce qui suggère que ce facteur soit particulier à chaque élevage et plutôt en relation avec des facteurs zootechniques.

Les autres facteurs non infectieux ont été limités au maximum dans notre étude. Effectivement, les prélèvements étaient réalisés dans les conditions de la traite, ce qui a considérablement limité l'impact du stress. En effet, ce facteur peut considérablement faire varier la CCS (145). De plus les prélèvements étaient toujours réalisés le matin, permettant d'éviter les variations entre les moments de la journée, et les premiers jets, moins concentrés en cellules, étaient exclus de l'analyse.

3.3. Etude bactériologique des échantillons de lait

3.3.1. Bactériologie conventionnelle

La prévalence des mammites subcliniques, estimée par la fréquence des isollements bactériens en bactériologie conventionnelle, était de 51.6% dans notre étude (Annexe 16). Elle est relativement élevée par rapport aux prévalences rapportées dans les études précédentes, dont la moyenne est de 35.0% (Annexe 7). Parmi les échantillons positifs, les identifications réalisées nous indiquent que l'on retrouve à 65.6 % des bactéries de type SCN. Ceci est en accord avec les autres études portant sur les mammites caprines qui dénombrent en moyenne 61.1% de SCN impliquées dans ces atteintes mammaires subcliniques. Parmi les SCN, les espèces prédominantes sont *S. epidermidis* et *S. caprae*, tout comme dans les études déjà publiées (Tableau I). La majorité des travaux réalisés sur ce sujet identifie ensuite principalement *S. xylosum*, *S. chromogenes* et *S. simulans*, ce qui est le cas dans notre étude sauf pour *S. simulans* qui n'est que peu isolé et représente seulement 1,5% des échantillons

positifs. Après les SCN, on retrouve les SCP qui sont présents dans 14,6% des échantillons positifs (Annexe 16). Cette valeur est comparable aux valeurs relevées dans les études, dont la moyenne est de 18,6% (Annexe 7). Ces SCP sont composés de *S. aureus*, ce qui est isolé couramment mais aussi et en majorité de *S. hyicus*, qui est plus rarement isolé dans les autres études. Une autre particularité de notre étude est la prévalence anormalement élevée de *Bacillus*, que l'on retrouve dans 9,6% des échantillons positifs. Or une prévalence élevée de *Bacillus* est généralement attribuée à de mauvaises pratiques d'hygiène dans l'élevage (155). Cela pourrait donc conforter l'hypothèse émise précédemment sur la cause des CCS élevées. Cependant, les échantillons dans lesquels *Bacillus* a été isolé sont tous issus de la première date de prélèvement ; ils ne sont pas retrouvés lors des prélèvements ultérieurs (Tableau V). Ainsi une contamination opérateur dépendante ou liée à l'ambiance peut être envisagée. De plus, tous ces échantillons ont des CCS très bas, avec une moyenne inférieure aux échantillons considérés comme stériles, ce qui appuie encore l'hypothèse d'une contamination au moment du prélèvement (Figure 17).

Lorsque les échantillons sont séparés en fonction de la lignée dont ils sont issus, on remarque que les échantillons des chèvres CCS+ sont significativement plus fréquemment positifs à la bactériologie conventionnelle avec 55,4% d'échantillons ayant conduit à un isolement, contre 47,1% pour la lignée CCS- (Figure 13). De plus, trois quarts des SCP, qui sont des agents pathogènes majeurs, ont été isolés chez des chèvres CCS+. Il a été confirmé ici que les SCP étaient bien les agents les plus virulents (40, 172), et ils provoquent une augmentation de la CCS très significativement plus grande que les autres agents pathogènes (Figure 17). De même la majorité des échantillons dans lesquels des SCN hautement pathogènes ont été isolés, comme *S. epidermidis*, *S. simulans* et *S. chromogenes* d'après la bibliographie (60, 84, 95, 96), proviennent de chèvres de la lignée CCS+ (Tableau III). Ainsi, les chèvres CCS+ ont un taux d'infection supérieur et sont infectées par des agents pathogènes plus virulents, ce qui peut en partie expliquer une concentration élevée de cellules. Il faut toutefois remarquer que dans notre étude les SCN, qui peuvent être considérés comme les plus pathogènes parmi cette catégorie de germes, car provoquant une augmentation de la CCS significativement plus grande, sont *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. simulans* et *S. xylosus*. Il n'y a pas de différence significative entre le taux d'infection par ces agents pathogènes entre les lignées CCS+ et CCS- (Figure 13).

Les SCP et SCN hautement pathogènes persistent beaucoup plus dans la mamelle que les autres agents pathogènes (Tableau VI). En effet, toutes les hémimamelles infectées par un

SCP, le sont restées jusqu'à la fin de la lactation, hormis une seule héli-mamelle de chèvre de la lignée CCS- où l'infection n'est plus détectée. Une étude avait montré chez la chèvre une persistance durant toute la lactation de 75% à 82% des infections par les SCN, et de 73% à 78% de celles par *S. aureus* (101). Ainsi, les agents pathogènes les plus virulents peuvent induire des concentrations cellulaires élevées durant toute la lactation. A l'inverse, les hémimamelles infectées par *Bacillus*, dont la moyenne des CCS est plus faible que les hémimamelles saines (Figure 17), sont toutes négatives à la bactériologie du prélèvement suivant (Tableau V). Ainsi *Bacillus*, induit une réaction inflammatoire très faible et il est très peu persistant s'il s'agit bien d'infection et non pas d'une contamination de l'échantillon. Il peut être considéré comme un agent pathogène mineur.

Enfin, le nombre de colonies estimé par bactériologie conventionnelle ne semble pas bien corrélé à la virulence de l'agent pathogène. En effet *S. lugdunensis* est l'espèce pour laquelle le plus grand nombre de colonies a été dénombré alors qu'il n'induit pas une augmentation de la CCS significative (Figure 14), ni ne fait partie des SCN hautement pathogènes d'après les études antérieures (59, 83, 94, 95). Au contraire, *S. simulans*, qui est classé comme un SCN hautement pathogène dans de nombreuses études et conformément à nos résultats, semble être présent en faible concentration d'après les résultats du dénombrement des colonies sur les géloses. Ce biais semble particulièrement vrai pour *S. simulans*, *S. warneri*, *S. hominis* et *S. cohnii* qui semblent être associés à des infections avec une grande quantité de bactéries, mais avec un nombre d'échantillons qui est cependant faible. La corrélation entre la concentration des bactéries estimée en bactériologie conventionnelle et la CCS ou la concentration d'un autre type cellulaire dans le lait n'est d'ailleurs pas très satisfaisante (Tableau 6.2). Ainsi se pose la question de la fiabilité du titre bactérien estimé par la bactériologie conventionnelle.

3.3.2. Bactériologie moléculaire

La technique de bactériologie moléculaire utilisée ici, permet de dénombrer les staphylocoques présents dans l'échantillon grâce à la PCR quantitative (qPCR). Cette technique semble bien adaptée à l'étude réalisée ici, car dans plus de 80% des échantillons positifs en bactériologie conventionnelle, un staphylocoque a été isolé (Figure 13), conformément à la connaissance de l'étiologie des infections mammaires chez la chèvre. Cette technique est beaucoup plus sensible (20) que la bactériologie conventionnelle pour identifier et quantifier les bactéries de ce genre. Une étude a montré que, alors que plus de

30% des échantillons de lait de vaches ayant une mammite sont reconnus « stériles » en bactériologie conventionnelle, ils ne sont que 15% avec la bactériologie moléculaire (76). Dans notre étude, seuls 15% des échantillons sont stériles à la bactériologie moléculaire contre 48% avec la bactériologie conventionnelle. En effet, certains échantillons « stériles » à la bactériologie conventionnelle contiennent des staphylocoques, qui n'ont pas été mis en évidence sur la gélose (Figure 16). D'autres échantillons dans lesquels un agent pathogène autre qu'un staphylocoque avait été isolé via la bactériologie conventionnelle, se révèlent positifs à la qPCR et contiennent donc un staphylocoque (Figure 16). Il semble donc que la bactériologie conventionnelle ne détecte pas les infections peu sévères. En effet, très peu d'échantillons ayant un titre bactérien inférieur à 1500 équivalents génomes/mL sont positifs à la bactériologie moléculaire (Annexe 17). La corrélation entre le caractère pathogène de l'espèce mise en évidence par la bactériologie conventionnelle (Figure 17) et le nombre de bactéries estimé par la qPCR ne semble pas très bonne (Figure 16). *S. aureus* et *S. hyicus* font bien partie des agents pathogènes qui ont la plus grande concentration bactérienne, mais ce n'est pas le cas pour tous les SCN hautement pathogènes. La bactériologie moléculaire a l'inconvénient de ne pas renseigner sur l'espèce bactérienne qui est présente. Ainsi on peut attribuer à *S. xylosus* isolé « à tort » en bactériologie conventionnelle, un titre bactérien élevé, alors que *S. xylosus* n'est pas en réalité le germe dominant et qu'une autre espèce de staphylocoque non détectée en bactériologie conventionnelle, est également présente à un titre élevé. En effet, si on se fie à la bactériologie conventionnelle, on devrait trouver un titre bactérien nul par bactériologie moléculaire pour les échantillons où *Corynebacterium* a été isolé, car il n'est pas détecté par la qPCR. Or ces échantillons font partie de ceux qui ont le titre bactérien le plus élevé, donc un staphylocoque, peut-être même un SCP, était présent en grande quantité et n'a pas été détecté par l'isolement (Figure 16).

Outre une meilleure sensibilité, la qPCR permet de repousser la limite supérieure du dénombrement. La bactériologie conventionnelle ne permet pas de compter plus de 200 UFC par boîte de Pétri, soit environ 10^4 UFC/mL, alors que la limite est 10^6 UFC/mL pour la bactériologie moléculaire. De plus la corrélation entre le nombre de bactéries dénombrées en qPCR et la CCS ou la concentration de n'importe quel type de leucocyte est meilleure que pour la bactériologie conventionnelle, avec une corrélation de 0,51 entre le SCS et le nombre de staphylocoques dénombrés par qPCR. (Tableau VIII). Cependant, la méthode est si sensible que le risque de faux positif est très grand et qu'il est particulièrement nécessaire

d'opérer avec une extrême rigueur pour éviter le risque de contamination de l'échantillon de lait.

Dans notre étude, il n'y a pas de différence significative entre la moyenne des titres bactériens de la lignée CCS+ et celle de la lignée CCS- en qPCR. Ceci est en contradiction avec les données de la bactériologie conventionnelle qui donne une différence significative de la fréquence d'infection, de la moyenne des titres bactériens et de la nature des agents bactériens identifiés. Cependant lorsque l'on s'intéresse à la distribution des échantillons en fonction du titre en staphylocoques, on s'aperçoit que les échantillons CCS – sont plus nombreux à avoir un titre bactérien faible, et inversement pour les échantillons CCS+ (Figure 15). Ainsi, même si les moyennes des titres bactériens ne sont pas significativement différentes entre les deux lignées, les échantillons des hémimamelles des chèvres CCS+ contiennent plus fréquemment des charges bactériennes élevées que ceux des chèvres CCS-.

Il semble donc que les deux techniques de bactériologie soient complémentaires. Dans l'étude, elles ont donc été combinées afin d'étudier la réponse inflammatoire locale en fonction de l'infection bactérienne et de la lignée.

3.4. Influence des caractéristiques liées à l'agent bactérien sur le profil cellulaire

Comme nous l'avons vu précédemment, la réponse inflammatoire locale est modulée par des facteurs intrinsèques à l'animal, dont la lignée à laquelle il appartient, mais aussi par son statut infectieux (Figure 9). Pour expliquer l'influence du type d'infection sur les concentrations cellulaires, des catégories ont été définies selon des critères de bactériologie conventionnelle et de bactériologie moléculaire. Le meilleur modèle explicatif pour le critère de la CCS a été retenu. Les échantillons dans lesquels *S. aureus* ou *S. hyicus* étaient isolés par bactériologie conventionnelle avaient des CCS très significativement plus élevées que les autres échantillons (Figure 17), et faisaient partie des échantillons dont le titre bactérien était particulièrement élevé (Figure 16), ce qui a conduit à en faire une catégorie à part. Pour déterminer les autres catégories, le critère du titre bactérien seul a été retenu, car il permettait d'obtenir un meilleur modèle. Pour discriminer les échantillons selon ce critère, les résultats de bactériologie moléculaire, qui est plus sensible et sans borne supérieure, ont été utilisés. La relation entre les catégories et la CCS n'est toutefois pas linéaire (Figure 18). En effet, il existe une inconnue majeure dans cette étude qui est liée à la cinétique de la réponse

inflammatoire par rapport à celle de l'infection. Ainsi un faible titre bactérien peut correspondre au début de l'infection où la réponse inflammatoire n'est pas encore apparue, donc la CCS est basse. En revanche, à la fin de l'infection, le titre bactérien bas correspondra à une infection maîtrisée par des leucocytes activés, et une CCS élevée y sera donc associée. De plus, selon l'agent pathogène incriminé, la réponse inflammatoire est plus ou moins longue à se mettre en place ; la cinétique est donc différente (22). Il aurait donc été intéressant d'étudier la cinétique du titre bactérien en parallèle de la cinétique d'excrétion cellulaire en répétant les analyses à des pas de temps beaucoup plus courts au cours de la même semaine par exemple. Cependant ces données sont difficiles à obtenir. Pour un agent pathogène donné, la cinétique peut fortement varier selon l'individu (175). De plus, au cours d'une même infection, le titre bactérien peut évoluer de manière cyclique, tout comme la CCS en parallèle ou de façon décalée (176). Ainsi une mesure à un jour donné n'est pas obligatoirement représentative du statut de l'animal puisque le caractère dynamique de l'infection n'est pas pris en compte, comme cela est observé chez des brebis de lignées divergentes après inoculation de *S. aureus* (177)(Annexe 20).

Malgré ce biais, lorsque l'on décompose les CCS en neutrophiles, vivants et morts, macrophages et lymphocytes, des différences significatives apparaissent entre les lignées sur la nature de leur réponse inflammatoire locale en fonction du type d'infection (Tableau IX). Les chèvres de la lignée CCS- ont significativement moins de chacun des types de leucocytes lorsqu'elles sont indemnes d'infection ou soumises à une infection faible, que celle-ci soit défini par son titre bactérien ou la virulence de l'agent pathogène impliqué (Figure 20). Ainsi les chèvres de la lignée CCS- auraient des concentrations basales de tous les types de leucocytes moins grandes que les chèvres de la lignée CCS+. Ceci conduit à une différence d'autant plus grande des CCS que le taux d'infection est inférieur ou tout au plus égal à celui des chèvres CCS+, selon la méthode de détermination du statut bactériologique qui est utilisée.

Lorsque l'infection est modérée, c'est-à-dire que le titre bactérien en staphylocoque autre que pathogène majeur est plus élevé, une augmentation très significative de tous les types de leucocytes est constatée chez les chèvres CCS- contrairement à la lignée CCS+. Cette réponse inflammatoire locale forte permet d'atteindre des concentrations en leucocytes équivalentes à celles des chèvres de la lignée CCS+ au statut infectieux faible ou modéré. Ainsi des concentrations élevées en leucocytes chez les chèvres CCS- sont plus spécifiques d'une infection que chez les chèvres CCS+, où les concentrations sont toujours élevées. Cela

indique qu'en présence d'une infection, les chèvres CCS- sont capables de mobiliser des cellules en quantité favorisant l'élimination du germe. Enfin, lors d'infection par un SCP, c'est à dire un agent pathogène majeur souvent associé à un titre bactérien très élevé, la concentration de leucocytes de la lignée CCS- n'est pas significativement augmentée, contrairement à celle de la lignée CCS+. Les chèvres de la lignée CCS- semblent donc avoir une réponse inflammatoire forte lorsqu'une infection apparaît, mais qui est régulée, même en présence d'un agent infectieux parmi les plus virulents. Une étude avait d'ailleurs montré que les chèvres de lignée CCS- avaient une réponse inflammatoire plus précoce dans le temps que les chèvres CCS+ après l'inoculation de *S. aureus*, ce qui entraînait une diminution plus marquée du titre bactérien 30 heures post inoculation (175). De plus cette combinaison de forts titres bactériens et de concentrations leucocytaires très élevées pour les échantillons contenant un SCP, particulièrement chez les chèvres CCS+, peut faire penser à une réponse inflammatoire qui ne parvient pas à juguler l'infection, malgré la forte mobilisation de leucocytes.

Concernant le rôle de chaque type cellulaire dans la réponse inflammatoire locale, il est possible que les lymphocytes jouent un rôle plus important dans la lignée CCS-. En effet, pour ce type cellulaire, la plus forte concentration basale de cellules de la lignée CCS+ est moins marquée que pour les autres types de leucocytes (Tableau IX). De plus, pour une infection modérée, les chèvres de la lignée CCS- excrètent plus de lymphocytes que celles de la lignée CCS+, alors que pour tous les autres types cellulaires et à tous statuts infectieux confondus, le nombre de cellules chez les chèvres de la lignée CCS+ est toujours plus grand (Figure 20). Enfin cette hypothèse est en accord avec le fait que le pourcentage de lymphocytes des échantillons de lait de chèvres CCS- était significativement plus élevé que celui des échantillons de chèvres CCS+ (Figure 8). Concernant la lignée CCS+, les PMN et les macrophages sont systématiquement plus abondants que dans les laits de chèvres CCS-. De plus, les seules augmentations significatives entre le statut infectieux faible et modéré chez les chèvres de la lignée CCS+, sont celles des macrophages, et surtout des PMN. Les chèvres de la lignée CCS+ semblent donc avoir une réponse inflammatoire dominée par la phagocytose, et une réponse inflammatoire innée plus marquée (170). La concentration des PMN morts reste quant à elle semblable, donc ce paramètre n'évolue pas en fonction de la charge bactérienne. Au contraire, les échantillons des chèvres CCS+ avec une infection forte, ont des concentrations en macrophages et en PMN, vivants ou morts, très significativement augmentées, et proportionnellement bien plus marquées que celles des lymphocytes. Les

chèvres CCS+ ont d'ailleurs des concentrations de PMN morts et de macrophages significativement supérieures à celles des chèvres CCS-. Ce taux de PMN apoptotiques plus élevé chez les chèvres CCS+ pourrait indiquer que la réponse inflammatoire est dépassée par l'infection ou qu'elle n'est pas adaptée pour permettre la survie cellulaire en présence du germe. Ainsi les chèvres CCS- auraient une réponse inflammatoire plus efficace lors d'infection par un pathogène majeur. D'ailleurs, il n'y a qu'une chèvre ayant réussi à éliminer une infection par un pathogène majeur, *S. hyicus*, et il s'agissait d'une chèvre CCS-. De plus, le premier prélèvement étant effectué au plus tôt un mois après le début de la lactation, il n'est pas impossible que d'autres chèvres aient éliminé leur infection avant le prélèvement. Ceci pourrait éventuellement expliquer le nombre plus faible d'échantillons contenant un agent pathogène majeur chez les chèvres de la lignée CCS- (Tableau III), en relation avec une durée plus courte des infections.

Cependant les résultats de ces interprétations sont à considérer avec précaution, particulièrement pour les infections dues à un pathogène majeur. En effet, nous ne disposons que de 5 échantillons de chèvres CCS-, infectées par un SCP, ce qui est faible et peut ne pas être très représentatif. D'ailleurs les écart-types de cette catégorie sont au moins deux fois plus grands que ceux des autres catégories (Figure 20). De plus il est possible que des échantillons classés comme « non-SCP » contiennent en fait un SCP non détecté en bactériologie conventionnelle.

Les chèvres CCS+ auraient donc une concentration cellulaire basale plus élevée, en particulier pour les cellules phagocytaires, alors que les chèvres CCS- auraient une quantité de lymphocytes dans le lait plus grande, et ces caractères sont exacerbés dès l'apparition d'une infection même modérée. Il semblerait par ailleurs que la réponse inflammatoire de la lignée CCS- soit plus efficace, mais le principal biais de cette interprétation réside dans la méconnaissance du stade de l'infection. La majorité des infections persistantes concernent tout de même les chèvres CCS+ (Tableau VI), ce qui est en faveur de cette hypothèse. Cependant autant de chèvres de la lignée CCS+ que de la lignée CCS- parviennent à éliminer l'agent pathogène après deux prélèvements positifs.

3.5. Evolution de la réponse inflammatoire locale et de l'infection au cours de la lactation

Afin d'approcher une analyse cinétique de l'inflammation sur le long terme, nous avons étudié la CCS et le statut infectieux des chèvres en fonction de la lignée en séparant les trois dates de prélèvement. A la première date, les échantillons des chèvres CCS+ contiennent très significativement plus de neutrophiles, morts ou vivants, et de macrophages que ceux des chèvres CCS- (Figure 12). En parallèle le statut infectieux en bactériologie conventionnelle est identique entre les deux lignées (Tableau IV), bien que plus favorable pour la lignée CCS- selon la bactériologie moléculaire (Tableau VII). Ces résultats confirment donc que les chèvres de la lignée CCS+ ont une concentration leucocytaire basale dans le lait plus élevée.

Entre le début et le milieu de lactation, le taux d'infection détecté par bactériologie conventionnelle diminue, même significativement pour les chèvres de la lignée CCS- (Tableau IV). En effet la majorité des agents pathogènes isolés au premier prélèvement ne semblent pas persister ; seuls 10% le font chez les chèvres CCS- contre 19% chez les chèvres CCS+ (Tableau VI). Le taux d'infections éliminées dans notre étude, évalué par la bactériologie conventionnelle, est très fort comparé à d'autres études décrivant 75% à 100% de persistance sur toute la lactation (97, 174). De plus ce sont quasi-exclusivement des SCP ou des SCN hautement pathogènes qui persistent, car ils sont plus difficiles à éliminer. Ces résultats sont en accord avec les précédentes études qui montraient que les staphylocoques étaient les plus persistants et qu'il existait des différences de persistance entre les espèces de staphylocoques (95, 96). Les chèvres CCS- semblent donc plus capables d'éliminer les agents infectieux et donc plus à même de combattre l'infection. En considérant la bactériologie moléculaire, le titre bactérien moyen augmente dans les deux lignées, alors que le taux d'infections diminue de façon similaire dans les deux lignées (Tableau VII). Cela appuie donc les résultats de la bactériologie conventionnelle, car certaines chèvres parviennent à éliminer l'infection, même si ici, il n'y a pas de différence entre les lignées. Cependant les chèvres ayant une infection persistante ont un titre bactérien augmenté, donc l'infection n'est pas jugulée. En effet, si l'infection n'est pas éliminée précocement, les bactéries se multiplient et sont d'autant plus difficiles à éliminer. La majorité des infections persistantes en milieu de lactation, sont d'ailleurs présentes en fin de lactation (Tableau VI). Concernant la réponse inflammatoire locale, la différence entre la présence de macrophages et de neutrophiles, morts ou vivants, est toujours très significative entre les deux lignées. Chez les deux lignées, la

moyenne de macrophages et neutrophiles vivants augmente entre le début et le milieu de la lactation. Ainsi il y aurait une persistance de la réponse médiée par les neutrophiles et les macrophages, bien que l'infection soit maîtrisée chez certaines chèvres, ou bien les chèvres n'ayant pas maîtrisé l'infection ou ayant une nouvelle infection sont en nombre suffisant pour faire augmenter la moyenne des concentrations de ces deux types cellulaires. En parallèle, la présence de neutrophiles morts diminue, ce qui conforte plutôt la première hypothèse, car une forte proportion de neutrophiles morts est le signe d'une infection non maîtrisée. Concernant les lymphocytes, leur quantité diminue, ainsi elle semble assez bien corrélée au statut infectieux et persiste moins que celle des neutrophiles ou des macrophages.

Il est toutefois important de noter, que la méthode FACS étant très spécifique, les cellules devaient être analysées intactes afin de ne pas avoir de résultats erronés. Ainsi le temps d'acheminement au laboratoire devait être le plus bref possible. Or celui-ci se trouvait à Toulouse, et lors de la première date de prélèvements la durée d'acheminement a été de 7-8 heures, ce qui a conduit à un taux de mortalité des cellules anormalement élevé. Lors des deux autres journées de prélèvements, la durée d'acheminement a été raccourcie à 5 heures. Ainsi la concentration importante en PMN morts à la première date peut être faussement exacerbée par cette erreur de gestion des prélèvements.

Enfin, entre le milieu et la fin de la lactation, le taux d'infection augmente dans les deux lignées avec beaucoup de nouvelles infections mais aussi la persistance de la quasi-totalité des infections détectées précédemment (Tableau VI). Cette augmentation est très significative chez les chèvres CCS+ et significative chez les CCS- en considérant le titre bactérien par bactériologie moléculaire. Cela est principalement dû à des infections persistantes par des SCP ou des SCN hautement pathogènes qui ont des titres bactériens particulièrement élevés. En parallèle, la concentration de tous les types de leucocytes est très significativement augmentée. Dans les études précédentes, il avait d'ailleurs été montré que l'effet du stade de lactation en fin de lactation était si important, qu'il n'y avait plus de différence observée entre les CCS des chèvres qu'elles soient infectées ou non (158). Dans notre étude, l'augmentation de la concentration en lymphocytes est encore plus importante que pour les autres types cellulaires (Figure 12). Les lymphocytes étant des acteurs majeurs de la réponse adaptative, leur augmentation est peut-être plus tardive, car elle nécessite une activation par des infections répétées. Du fait de la répétition des infections au cours de la lactation et du cumul de nouvelles infections et d'infections persistantes, une immunisation vis à vis des bactéries responsables de mammites pourrait apparaître. Cette hypothèse pourrait

être cohérente avec l'augmentation significative du taux de lymphocyte chez les chèvres en deuxième lactation (Tableau II), ou ayant un rang de lactation plus avancé (117, 144, 158). Il faut toutefois rester prudent dans l'interprétation du taux de lymphocytes dénombré par la cytométrie en flux, car une confusion est possible avec des PMN morts en cas d'apoptose massive des PMN, qui est plus marquée en fin de lactation. Ainsi pour confirmer notre hypothèse, il faudrait typer les lymphocytes excrétés dans le lait, car en cas de réponse à une infection mammaire ce sont principalement les lymphocytes CD4+ qui prédominent (136). Enfin toutes nos valeurs concernant les leucocytes sont des concentrations, or la quantité de lait produite diminue très significativement en fin de lactation. Même si l'augmentation de tous les leucocytes reste significative en enlevant l'effet concentration, cet effet majeure tout de même l'augmentation de la concentration des cellules comme présenté à la Figure 12.

Il semble donc que la quantité de neutrophiles et de macrophages augmente tout au long de la lactation indépendamment du statut infectieux, contrairement à celle de lymphocytes. Cependant on ne peut pas étudier ici la cinétique de la réponse inflammatoire en relation avec l'infection, car l'occurrence des infections au cours de la lactation n'est pas connue, particulièrement à la fin de la lactation. Il serait donc intéressant de sélectionner des chèvres avec une infection persistante pour les suivre, et d'exclure les chèvres ayant une nouvelle infection au cours de la lactation. Cependant nous ne disposons que de 11 hémimamelles ayant une infection persistante sur les trois dates, et parmi elles, seulement trois CCS- étaient présentes. Ainsi il n'a pas été possible de faire une comparaison statistique. Il serait donc intéressant pour approfondir ces résultats, d'étudier un plus grand nombre de chèvres ayant une infection persistante, si possible avec un même agent pathogène en connaissant au maximum l'ancienneté de l'infection, avec un suivi de manière plus rapprochée dans le temps. En effet, dans cette étude, le suivi du statut infectieux et de la réponse inflammatoire locale ne permet pas d'établir une cinétique, car certains échantillons de la troisième date de prélèvement sont la conséquence d'une infection persistante depuis le début de la lactation ; alors que d'autres sont issus d'une nouvelle infection débutante, ce qui n'est pas comparable au plan infectieux et immunologique. De plus, pour une même date de prélèvement, il y a 7 semaines de décalage dans la lactation entre les chèvres ayant mis bas en premier et celles qui ont mis bas en dernier, ce qui représente presque le même écart qu'entre deux prélèvements, donc le facteur stade de lactation est biaisé.

3.6. Impact de la sélection génétique sur les caractères de production laitière

D'après les résultats précédents, il semble bénéfique de sélectionner les chèvres sur le critère CCS, car chez les chèvres issues de la lignée favorable, les infections sont moins fréquentes ou persistent moins longtemps et la réponse inflammatoire locale serait plus efficace. Cependant, la sélection génétique a toujours été effectuée sur des critères de production laitière chez la chèvre, dans le but d'augmenter la quantité de lait produite, les taux butyreux et protéique. Il est donc important de s'intéresser aux effets que peut avoir une sélection sur le critère CCS, sur les caractères de production laitière.

Le facteur lignée a un effet significatif sur la quantité de lait produite (Tableau X). Les chèvres de la lignée CCS+ produisent significativement plus de lait en moyenne que les chèvres de la lignée CCS-. Ceci peut donc être un frein à la sélection, compte tenu des objectifs de sélection actuels et du prix de vente du lait de chèvre. Cependant, ce sont surtout les ruminants avec les productions laitières plus élevées qui sont sujets aux mammites ; ainsi il semble inévitable que la sélection sur la résistance aux mammites entraîne une contre-sélection de chèvres produisant moins de lait. Cependant, les chèvres atteintes de mammites subissent une baisse significative de la production laitière, due à l'altération de leurs cellules épithéliales par les bactéries et par les dommages causés par la réaction inflammatoire (161, 172). Ainsi la perte de production laitière causée par la sélection devrait être comparée à celle due à une infection, qui est plus probable chez les chèvres de la lignée CCS+. Nos observations semblent toutefois être défavorables à la sélection sur le critère CCS sur ce point car la production des chèvres sensibles aux mammites reste plus élevée.

Les chèvres de la lignée CCS+ ont un taux protéique significativement plus bas que les chèvres CCS-. Or les variations de TP dépendent de la variation du taux de caséine, qui diminue lors d'infection par défaut de synthèse, et de la variation du taux de lactosérum qui contient les protéines inflammatoires, qui lui augmente lors d'infection (97), en particulier lors d'infection par un SCP (Figure 21). Or ce sont les chèvres de la lignée CCS+ qui sont majoritairement infectées par des SCP (Annexe 16). Ainsi soit les chèvres de la lignée CCS+ produisent très significativement moins de caséine, ce qui est peu probable, car d'après les études précédentes, le taux de caséine diminue peu lors d'infections (164), soit les chèvres de la lignée CCS- produisent significativement plus de protéines inflammatoires. Il faudrait donc

doser les caséines en parallèle du TP, car la première hypothèse serait favorable à la sélection sur le critère de la CCS car plus compatible avec la fromagibilité du lait.

Enfin, aucune différence significative n'est notée dans notre étude sur le taux butyreux. Dans les études précédentes, une opposition génétique entre ce caractère et le SCS avait toutefois été constatée dans la race Alpine (19).

Ainsi les résultats des caractères de production semblent plutôt en défaveur d'une sélection sur le critère CCS. Une étude plus approfondie des coûts associés à la perte de production de lait et à ceux engendrés par une occurrence plus grande de mammites dans la lignée CCS+ serait intéressante afin d'objectiver l'intérêt économique de cette sélection.

Conclusion

Conformément aux études précédentes, notre étude sur 53 chèvres issues des lignées divergentes sur le critère de la CCS a confirmé que les chèvres de la lignée CCS- produisaient du lait moins riche en leucocytes que les chèvres de lignée CCS+. Une première explication réside dans le fait que la fréquence des infections tend à être moins élevée d'après la bactériologie conventionnelle comme moléculaire. De plus, ces chèvres sont moins fréquemment infectées par des agents hautement pathogènes, qui sont ceux qui provoquent une augmentation de l'excrétion leucocytaire significativement supérieure comme *S. aureus* et *S. hyicus*, et dans une moindre mesure *S. epidermidis*, *S. caprae*, *S. xylosus* et *S. simulans*.

Hormis des charges bactériennes moindres dans la lignée CCS-, la concentration cellulaire basale de cette lignée est très significativement inférieure à celle des chèvres CCS+, en particulier en ce qui concerne les neutrophiles et les macrophages.

Concernant la réponse inflammatoire locale lors de mammites, les chèvres CCS- semblent mettre en place une réponse inflammatoire probablement plus efficace. En effet, dans notre étude, le nombre d'infections persistantes est trois fois moindre chez les chèvres CCS- en considérant la lactation dans son ensemble. Ainsi l'élimination rapide de l'infection réduit la multiplication des bactéries, qui accroît le recrutement des leucocytes retrouvés en partie dans le lait. De plus, même à statut infectieux équivalent, les échantillons de lait des chèvres CCS- contiennent significativement moins de macrophages et de neutrophiles, vivants ou apoptotiques.

La réponse inflammatoire semble diverger sur certains points entre les deux lignées. Les chèvres de la lignée CCS+ excrètent toujours beaucoup plus de cellules et particulièrement de cellules phagocytaires (neutrophiles et macrophages). Les chèvres CCS- quant à elles ont proportionnellement plus de lymphocytes, qui sont des cellules de la réponse immunitaire acquise. Des études complémentaires semblent nécessaires afin de mieux aborder la caractérisation de la réponse immunitaire mammaire dans cette espèce. Il faudrait par exemple provoquer des infections expérimentales avec un agent pathogène et réaliser des prélèvements réguliers et fréquents, afin de suivre les cinétiques d'excrétions bactérienne et cellulaire.

Enfin cette étude a mis en évidence qu'il existait d'importants effets liés à l'animal, particulièrement le stade de lactation, car quelle que soit la lignée les concentrations de tous les types cellulaires augmentent très significativement en fin de lactation. Les effets du rang de lactation et de l'âge de la chèvre ont aussi un effet sur la concentration en lymphocytes. Cependant cette augmentation peut aussi être liée à une infection par le CAEV, dont la prévalence dans ce troupeau n'était pas connue.



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 LIARD Mathilde intitulée « Analyses bactériologiques et cellulaires des échantillons de lait chez des chèvres après sélection divergente sur la résistance aux mammites » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 30 mai 2017
Professeur Gilles FOUCRAS
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

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



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Eric OSWALD

Professeur Eric OSWALD
Chef de Service
Laboratoire de Bactériologie-Hygiène
Institut Fédératif de Biologie
330 av. de Grande Bretagne - TSA 40031
31069 TOULOUSE CEDEX 9

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

Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation.
La Vice-présidente de la CPVU

Régine ALBALADEBRET

Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.



Références bibliographiques

1. BERGONIER, D., DE CREMOUX, R., RUPP, R., LAGRIFFOUL, G. et BERTHELOT, X. Mastitis of dairy small ruminants: Review article. *Veterinary Research*. 2003. Vol. 34, pp. 689- 716.
2. LEITNER, G., SILANIKOVE, N. et MERIN, U. Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. *Small Ruminant Research*. 2008. N° 74, pp. 221- 225.
3. MALHER, X., SEEGERS, H. et BEAUDEAU, F.4. Culling and mortality in large dairy goat herds managed under intensive conditions in western France. *Livestock Production Science*. 2001. N° 71, pp. 75- 86.
4. LEITNER, G., MERIN, U. et SILANIKOVE, N. Changes in Milk Composition as Affected by Subclinical Mastitis in Goats. *Journal of Dairy Science*. 2004. Vol. 87, pp. 1719- 1726.
5. DELANDES, H. *Étude de l'activité lipasique des cellules somatiques du lait de chèvre*. Rapport de DEA. Université de Technologie de Compiègne, 1998.
6. MORGAN, F. Cellules somatiques du lait de chèvre : conséquences sur la composition du lait et la technologie. *L'égide*. 1999. N° 17, pp. 1- 4.
7. RICHEZ-LEROUGE, V. France, ton fromage fout le camp !, Michel Lafon. 2012.
8. LE LOIR, Y., BARON, F. et GAUTIER, M. Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*. 2003. Vol. 1, n° 2, pp. 63- 76.
9. DE CREMOUX, R. Programme de contrôle des comptages de cellules somatiques de troupeaux : mise au point, application et évaluation de stratégies de contrôle des comptages de cellules somatiques en élevage caprin. *Rapport n°1454*. Institut de l'élevage. pp. 71.
10. BAUDRY, C., MERCIER, P., MALLEREAU, M.P. et LENFANT, D. Evaluation de l'efficacité du post-trempeage chez la chèvre. *Rev. Med. Vet.* 2000. N° 151, pp. 1035- 1040.
11. DE CREMOUX, R., POUTREL, B., COCHARD, T., CROUIN, P., POIRIER, V., VERNEAU, D. et BILLON, P. Efficacité et faisabilité du pré-trempeage des trayons chez la chèvre. *Bulletin GTV*. 2010. N° 56, pp. 27- 34.
12. LE MENS, P. La traite mécanique des chèvres. *La chèvre*. 1979. Vol. 126, pp. 32- 36.
13. BILLON, P. et BARITAUX, B. Intérêt d'un système de dépose automatique des faisceaux trayeurs pour la traite des chèvres. *Institut de l'élevage*. 2001. Vol. rapport n°20131, pp. 19.
14. SERVI, A., MASSA, S., ANNICCHIARICO, G., DELL' AQUILA, S. et MUSICIO, A. Effect of stocking density on ewes' milk yield, udder health and microenvironment. *Journal of Dairy Research*. Vol. 66, n° 4, pp. 489- 499.
15. ROVAI, M., THOMAS, D.L., BERGER, Y. et CAJA, G. Udder morphology and effects on milk production and ease of milking in dairy sheep. *Proceedings of the 10th Great Lakes Dairy Sheep Symposium*. 2004. pp. 37.

16. HADIMLI, H.H., ERGANIS, O., KAV, K. et SAYIN, Z. Evaluation of a combined vaccine against staphylococcal mastitis in ewes. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. 2005. Vol. 49, n° 179- 182.
17. TOLLERSRUD, T., NORSTEDO, P.E., ENGVIK, J.P., ANDERSEN, S.R., REITAN, L.J. et LUND, A. Antibody responses in sheep vaccinated against *Staphylococcus aureus* mastitis: a comparison of two experimental vaccines containing different adjuvants. *Veterinary Research Communications*. 2002. Vol. 26, pp. 587- 600.
18. PEREZ, M.M., PRENAFETA, A., VALLE, J., PENADES, J., ROTA, C., SOLANO, C. et MARCO, J. Protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl β -1,6 glucosamine specific antibody production using biofilm-embedded bacteria. *Vaccine*. Vol. 27, n° 17, pp. 2379- 2386.
19. RUPP, R., CLEMENT, V., PIACERE, A., ROBERT-GRANIE, C. et MANFREDI, E. Genetic parameters for milk somatic cell score and relationship with production and udder type traits in dairy Alpine and Saanen primiparous goats. *Journal of Dairy Science*. 2011. Vol. 94, pp. 3629- 3634.
20. HUAU, C., FOUCRAS, G., TABOURET, G., BOUVIER, F., FASSIER, T., RAINARD, P., MARTIN, P., TOSSER-KLOPP, G. et RUPP, R. L'amélioration génétique sur le comptage de cellules somatiques du lait s'accompagne d'une meilleure qualité hygiénique chez la chèvre. *Renc. Rech. Ruminants*. 2015.
21. CAILLAT, H., BOUVIER, F., RAINARD, P., MARTIN, P., CLEMENT, V., LARROQUE, H., GUERY, E. et RUPP, R. Réponse à une sélection divergente sur la concentration de cellules somatiques du lait chez la chèvre Alpine. *Renc. Rech. Ruminants*.
22. BONNEFONT, C. *Analyses génomiques fonctionnelles de la résistance aux mammites : études de deux lignées divergentes de brebis sélectionnées sur la concentration cellulaire du lait*. Toulouse : Institut National Polytechnique de Toulouse, 2011.
23. RUPP, R., PALHIÈRE, I., MAROTEAU, C., BALLOCHE, G., SALLE, G., TIRCAZES, A., MORENO, C., FOUCRAS, G. et TOSSER-KLOPP, G. Mapping QTL Controlling Milk Somatic Cell Counts in Sheep and Goat Support the Polygenic Architecture of Mastitis Resistance. *Proceedings, 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production*. 2014.
24. RUPP, R. et FOUCRAS, G. Breeding for Disease Resistance in Farm Animals. In : . S.C. Bishop et al. 2010. CAB International.
25. BONNEFONT, C., TOUFEER, M., CAUBET, C., FOULON, E., TASCA, C., AUREL, M.R., BERGONIER, D., BOULLIER, S., ROBERT-GRANIE, C., FOUCRAS, G. et RUPP, R. Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics*. 2011. Vol. 12, n° 208.
26. TOUFEER, M., BONNEFONT, C., FOULON, E., CAUBET, C., TASCA, C., AUREL, M.R., ROBERT-GRANIE, C., RUPP, R. et FOUCRAS, G. Gene Expression Profiling of Dendritic Cells Reveals Important Mechanisms Associated with Predisposition to *Staphylococcus* Infections. *Plos One*. 2011. Vol. 6, n° 8.
27. PAAPE, M.J., POUTREL, B., CONTRERAS, A., MARCO, J.C. et CAPUCO, A.V. Milk somatic cells and lactation in small ruminants. *Journal of Dairy Science*. Vol. 84, n° 237- 244.
28. MARINOT, C. et MARISSAL, H. *Intérêt de l'examen clinique mammaire et de la spectrométrie en moyen infra-rouge pour le dépistage des mammites chroniques de la chèvre*. Thèse de doctorat vétérinaire. Toulouse : Paul Sabatier, 2016.

29. CONTRERAS, A., SIERRA, D., CORRALES, J., SANCHEZ, A. et MARCO, J. Physiological threshold of somatic cell count and california mastitis test for diagnosis of caprine subclinical mastitis. *Small Ruminant Research*. 1996. Vol. 21, n° 3, pp. 259- 264.
30. MCDOUGALL, S., MURDOUGH, P., PANKEY, J.W., DELANEY, C., BARLOW, J. et SCRUTON, D. Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Research*. 2001. Vol. 40, pp. 245- 254.
31. SCHALM, O.W., CARROL, E.J. et JAIN, N.C. Bovine mastitis. *Lea and Febiger*. 1971. pp. 360p.
32. ZENG, S.S., ESCOBAR, E.N., HART, S.P., HINCKLEY, L., BAULTHAUS, M., ROBINSON, G.T. et JAHNKE, G. Comparative study of the effects of testing laboratory, counting method, storage and shipment on somatic cell counts in goat milk. *Small Ruminant Research*. 1999. Vol. 31, pp. 103- 107.
33. DE CREMOUX, R. Un dossier dédié aux mammites caprines [en ligne]. Disponible. <http://idele.fr/rss/publication/idelesolr/recommends/dossiermammites-caprines.html>. 2012.
34. JIMENEZ-GRANADO, R., SANCHEZ-RODRIGUEZ, M., ARCE, C. et RODRIGUEZ-ESTEVEZ, V. Factors affecting somatic cell count in dairy goats: a review. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2014. Vol. 12(1), pp. 133- 150.
35. DUBLIN, A.M., PAAPE, M.J. et WERGIN, W.P. Differentiation and Enumeration of Somatic Cells in Goat Milk. *Journal of Food Protection*. 1982. Vol. 45, n° 5, pp. 435- 439.
36. GRAPPIN, R. et JEUNET, R. Premiers essais de l'appareil "Fossomatic " pour la détermination automatique du nombre de cellules du lait. In : *Le Lait*. INRA. 1974. pp. 687- 644. 54.
37. POUTREL, B. et LERONDELLE, C. Cell content of goat milk : Californian Mastitis Test, Coulter Counter, and Fossomatic for predicting half infection. *Journal of Dairy Science*. 1983. Vol. 66, pp. 2575- 2579.
38. GONZALO, C., MARTNEZ, J.R., CARRIEDO, J.A. et SAN PRIMITIVO, F. Fossomatic cell-counting on ewe milk: comparison with direct microscopy and study of variation factors. *Journal of Dairy Science*. 2003. Vol. 86, n° 1, pp. 138- 145.
39. ZENG, S.S. Comparison of goat milk standards with cow milk standards for analyses of somatic cell count, fat and protein in goat milk. *Small Ruminant Research*. 1996. Vol. 21, pp. 221- 225.
40. HAENLEIN, F.W. Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. *Small Ruminant Research*. 2002. Vol. 45, pp. 163- 178.
41. KOESS, C. et HAMANN, J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *Journal of Dairy Research*. 2008. Vol. 75, n° 2, pp. 225- 232.
42. BOULAABA, A., GRABOWSKI, N. et KLEIN, G. Differential cell count of caprine milk by flow cytometry and microscopy. *Small Ruminant Research*. 2011. Vol. 97, pp. 117- 123.
43. DARZYNKIEWICZ, Z., BRUNO, S., DEL BINO, G., GORCZYCA, W., HOLTZ, M.A., LASSOTA, P. et TRAGANOS, F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*. Vol. 13, pp. 795- 808.

44. HAGELTORN, M. et SAAD, M.A. Flow cytofluorometric characterization of bovine blood and milk leukocytes. *American Journal of Veterinary Research*. 1986. Vol. 47, pp. 2012- 2016.
45. KELLY, A.L., TIERNAN, D., O'SULLIVAN, C. et JOYCE, P. Correlation between bovine milk somatic cell count and polymorphonuclear leukocyte level for samples of bulk milk and milk from individual cows. *Journal of Dairy Science*. 2000. Vol. 83, pp. 300- 304.
46. PILLAI, S.R., KUNZE, E., SORDILLO L.M. et JAYARAO, B.M. Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. *Journal of Dairy Science*. 2001. Vol. 84, pp. 1413- 1420.
47. RIVAS, A.L., QUIMBY, F.W., BLUE, J. et COKSAYGAN, O. Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2001. Vol. 13, pp. 399- 407.
48. DIAZ, J.R., ROMERO, G., MUELAS, R., ALEJANDRO, M. et PERIS, C. Effect of intramammary infection on milk electrical conductivity in Murciano-Granadina goats. *Journal of Dairy Science*. 2012. Vol. 95, pp. 718- 726.
49. TANGORRA, F.M., ZANINELLI, M., COSTA, A., AGAZZI, A. et SAVOINI, G. Milk electrical conductivity and mastitis status in dairy goats: Results from a pilot study. *Small Ruminant Research*. Vol. 90, pp. 109- 113.
50. DIAZ, J.R., ROMERO, G., MUELAS, R., SENDRA, E., PANTOJA, J.C.F. et PAREDES, C. Analysis of the influence of variation factors on electrical conductivity of milk in Murciano-Granadina goats. *Journal of Dairy Science*. 2011. Vol. 94, pp. 3885- 3894.
51. GERARDI, G., BERNARDINI, D., AZZURRA ELIA, C., FERRARI, V., JOB, L. et SEGATO, S. Use of serum amyloid A and milk amyloid A in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. *The Journal of Dairy Research*. Vol. 76, pp. 411- 417.
52. MOLENAAR, A., HARRIS, D., RAJAN, G., PEARSON, M., CALLAGHAN, M., SOMMER, L., FARR, V. et ODEN, K. The acute phase protein serum amyloid A3 is expressed in the bovine mammary gland and plays a role in host defence. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*. Vol. 14, pp. 26- 37.
53. MAISI, P. Analysis of physiological changes in caprine milk with CMT, NAGase and antitrypsin. *Small Ruminant Research*. 1990. Vol. 3, pp. 485- 501.
54. CONNEELY, O.M. Antiinflammatory activities of lactoferrin. *Journal of the American College of Nutrition (Supplement)*. 2001. Vol. 20, pp. 389- 397.
55. CHEN, P.W., CHEN, W.C. et MAO, F.C. Increase of lactoferrin concentration in mastitic goat milk. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*,. 2004. Vol. 66, pp. 345- 350.
56. HISS, S., MEYER, T. et SAUERWEIN, H. Lactoferrin concentrations in goat milk throughout lactation. *Small Ruminant Research*. 2008. Vol. 80, pp. 87- 90.
57. BARTH, K., AULRICH, K., MÜLLER, U. et KNAPPSTEIN, K. Somatic cell count, lactoferrin and NAGase activity in milk of infected and non-infected udder halves of dairy goats. *Small Ruminant Research*. 2010. Vol. 94, pp. 161- 166.

58. KITCHEN, B.J., KWEE, W.S., MIDDLETON, G. et ANDREWS, R.J. Relationship between the level of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) in bovine milk and the presence of mastitis pathogens. *Journal of Dairy Research*. 1984. Vol. 51, pp. 11- 16.
59. LEITNER, G., MERIN, U., SILANIKOVE, N., EZRA, E. et CHAFFER, M. Effect of subclinical intramammary infection on somatic cell counts, NAGase activity and gross composition of goats' milk. *Journal of Dairy Research*. 2004. N° 71, pp. 311- 315.
60. PERDIGON, G., MEDICI, M., CECILIA, M., DE MACIAS, M.E., HAEDO, R., OLIVER, G. et DE RUIZ HOLGADO, A.A. Significance of the presence of bovine milk beta-glucuronidase in mastitis detection. *Journal of Dairy Science*. 1986. Vol. 69, pp. 27- 31.
61. NAGAHATA, H., SAITO, S. et NODA, H. Changes in N-acetyl-B-D-glucosaminidase and B-glucuronidase activities in milk during bovine mastitis. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 1987. Vol. 51, pp. 126- 134.
62. KHODKE, M.V., BONDE, S. et AMBADE, R.B. Enzymatic changes in goat milk and udder health status. *Indian Journal of Field Veterinarians*. 2009. Vol. 4, pp. 17- 19.
63. KATSOULOS, P.D., CHRISTODOULOPOULOS, G., MINAS, A., KARATZIA, M.A., POURLIOTIS, K. et KRITAS, S.K. The role of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase in the diagnosis of subclinical intramammary infections in dairy sheep and goats. *The Journal of Dairy Research*. 2010. Vol. 77, pp. 107- 111.
64. SEIFU, E., DONKIN, E.F. et BUYS, E.M. Potential of lactoperoxidase to diagnose subclinical mastitis in goats. *Small Ruminant Research*. 2007. Vol. 69, pp. 154- 158.
65. MILLER, R.H. Traits for sire selection related to udder health and management. *Journal of Dairy Science*. 1984. Vol. 67, n° 2, pp. 459- 471.
66. HOGAN, S.J., GONZALEZ, N.R., HARMON, J.R., NICKERSON, C.S., OLIVER P.S., PANKEY, J.W. et SMITH, K.L. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. In : . Revised Edition. Madison, USA : NMC Inc, 1999.
67. PATERNA, A., CONTRERAS, A., GOMEZ-MARTIN, A., AMORES, J., TATAY-DUALDE, J., PRATS-VAN DER HAM, M., CORRALES, J., SANCHEZ, A. et DE LA FE, C. The diagnosis of mastitis and contagious agalactia in dairy goats. *Small Ruminant Research*. 2014. Vol. 121, pp. 36- 41.
68. SEARS, P.M., GONZALEZ, R.N., WILSON, D.J. et HAN, H.R. Procedures for mastitis diagnosis and control. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 1993. Vol. 9, pp. 445- 468.
69. ROVAI, M., CAJA, G., SALAMA, A.A.K., JUBERT, A., LAZARO, B., LAZARO, M. et LEITNER, G. Identifying the major bacteria causing intramammary infections in individual milk samples of sheep and goats using traditional bacteria culturing and real-time polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*. 2014. Vol. 97, pp. 5393- 5400.
70. BECKER, C., RAMOS, F., SELLAL, E., MOINE, S., POUMARAT, F. et TARDY, F. Development of a multiplex real-time PCR for contagious agalactia diagnosis in small ruminants. *Journal of Microbiological Methods*. 2012. Vol. 90, pp. 73- 79.
71. GIBSON, U.E., HEID, C.A. et WILLIAMS, P.M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*. 1996. Vol. 6, pp. 995- 1001.

72. BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2000. Vol. 25, pp. 169- 193.
73. BARKEMA, H.W., SCHUKKEN, Y.H. et ZADOKS, R.N. The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*. 2006. Vol. 89, n° 6, pp. 1877- 1895.
74. AMORES, J., SANCHEZ, A., MARTIN, A.G., CORRALES, J.C., CONTRERAS, A. et DE LA FE, C. Viability of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in goat milk samples stored under different conditions. *Veterinary Microbiology*. 2010. Vol. 145, pp. 347- 350.
75. KOSKINEN, M.T., WELLENBERG, G.J., SAMPIMN, O.C., HOLOPAINEN, J., ROTHKAMP, A., SALMIKIVI, L., VAN HAERINGEN, W.A., LAM, T.J. et PYORALA, S. Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *Journal of Dairy Science*. 2010. Vol. 93, n° 12, pp. 5707- 5715.
76. TAPONEN, S., SALMIKIVI, L., SIMOJOKI, H., KOSKINEN, M.T. et PYORALA, S. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *Journal of Dairy Science*. 2009. Vol. 92, pp. 2610- 2617.
77. BERGONIER, D., BLANC, M.C., FLEURY, B., LAGRIFFOUL, G., BARILLET, F. et BERTHELOT, X. Les mammites des ovins et des caprins laitiers: étiologie, épidémiologie, contrôle. *Renc. Rech. Ruminants*. 1997. Vol. 4, pp. 251- 260.
78. CONTRERAS, A., SIERRA, D., SANCHEZ, A. et GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*. 2007. N° 68, pp. 145- 153.
79. AMEH, J.A. et TARI, I.S. Observations on the prevalence of caprine mastitis in relation to predisposing factors in Maiduguri. *Small Ruminant Research*. 2000. N° 35, pp. 1- 5.
80. DA SILVA, E., BOECHAT, J. U., MARTINS, J. C., FERREIRA, W. P., SIQUEIRA, A. P. et DA SILVA, N. Hemolysin production by *Staphylococcus aureus* species isolated from mastitic goat milk in Brazilian dairy herds. *Small Ruminant Research*. janvier 2005. Vol. 56, n° 1- 3, pp. 271- 275.
81. MAISI, P. et RIIPINEN, I. Pathogenicity of different species of staphylococci in caprine udder. *British Veterinary Journal*. 1991. Vol. 147, n° 2, pp. 126-132.
82. DE CREMOUX, R. *Relations entre les numérations cellulaires du lait et les infections mammaires chez la chèvre*. Toulouse : Paul Sabatier, 1995.
83. KOOP, G., DE VliegHER, S., DE VISSCHER, A., SUPRÉ, K., HAESBROUCK, F., NIELEN, M. et VAN WERVEN, T. Differences between coagulase-negative *Staphylococcus* species in persistence and in effect on somatic cell count and milk yield in dairy goats. *Journal of Dairy Science*. septembre 2012. Vol. 95, n° 9, pp. 5075- 5084.
84. MCDUGALL, S, MALCOLM, D et PROSSER, Cg. Prevalence and incidence of intramammary infections in lactating dairy goats. *New Zealand Veterinary Journal*. 4 mai 2014. Vol. 62, n° 3, pp. 136- 145.
85. MCDUGALL, S., SUPRE, K., DE VliegHER, S., HAESBROUCK, F., HUSSEIN, H., CLAUSEN, L. et PROSSER, C. Diagnosis and treatment of subclinical mastitis in early lactation in dairy goats. *Journal of Dairy Science*. 2010. Vol. 93, n° 10, pp. 4710- 4721.

86. CAPURRO, A., CONCHA, C., NILSSON, L. et OSTENSSON, K. Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Acta. Vet. Scand.* 1999. Vol. 40, n° 4, pp. 315- 21.
87. RAINARD P., CORRALES, J.C., BARRIO, M.B., COCHARD, T. et POUTREL, B. Leucotoxic Activities of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Cows, Ewes, and Goats with Mastitis: Importance of LukM/LukF'-PV Leukotoxin. *Clin Vaccine Immunol.* 2003. Vol. 10, n° 2, pp. 272- 277.
88. MERCIER, P., MALLEREAU, M.P., LENFANT, D., PERRIN, G. et VERNZOY-ROZAND, C. Evaluation de la qualité hygiénique des laits de chèvre. *Renc. Rech. Ruminants.* 2000. Vol. 7, pp. 312.
89. CONTRERAS, A., CORRALES, J.C., SIERRA, D. et MARCO, J. Prevalence and aetiology of non-clinical intramammary infection in Murciano-Granadina goats. *Small Ruminant Research.* 1995. N° 17, pp. 71- 78.
90. MAROGNA, G., PILO, C., VIDILI, A., TOLA, S., SCHIANCHI, G. et LEORI, S.G. Comparison of clinical findings, microbiological results, and farming parameters in goat herds affected by recurrent infectious mastitis. *Small Ruminant Research.* janvier 2012. Vol. 102, n° 1, pp. 74- 83.
91. MERCIER, P., BAUDRY, C., LENFANT, D. et MALLEREAU, M.P. Etude de l'efficacité d'un traitement antibiotique au tarrissement chez la chèvre. *Recl. Med. Vet.* 1998. Vol. 174, pp. 7- 14.
92. KYOZAI, J.K., VEARY, C.M., PETZER, I-M. et DONKIN, E.F. Microbiological quality of goat's milk obtained under different production systems. *JS Afr. Vet. Assoc.* 2005. Vol. 76, pp. 69- 73.
93. GELASAKIS, A.I., ANGELIDIS, A.S., GIANNAKOU, R., FILIOUSSIS, G., KALAMAKI, M.S. et ARSENOS, G. Bacterial subclinical mastitis and its effect on milk yield in low-input dairy goat herds. *Journal of Dairy Science.* mai 2016. Vol. 99, n° 5, pp. 3698- 3708.
94. DEINHOFER, M. et PERNTHANER, A. *Staphylococcus* spp. as mastitis-related pathogens in goat milk. *Veterinary Microbiology.* 1995. Vol. 43, pp. 161- 166.
95. CONTRERAS, A., CORRALES, J.C., SANCHEZ, A. et SIERRA, D. Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. *Journal of Dairy Science.* 1997. N° 80, pp. 2815- 2819.
96. MORONI, P., PISONI, G., ANTONINI, M., RUFFO, G., CARLI, S., VARISCO, G. et BOETTCHER, P. Subclinical mastitis and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from two italian goat herds. *Journal of Dairy Science.* 2005. Vol. 88, n° 5, pp. 1694- 1704.
97. LEITNER, G., MERIN, U., LAVI, Y., EGBER, A. et SILANIKOVE, N. Aetiology of intramammary infection and its effect on milk composition in goat flocks. *Journal of Dairy Research.* 2007. N° 74, pp. 186- 193.
98. AULRICH, K. et BARTH, K. Intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci and the effect on somatic cell counts in dairy goats. *vTI. Agric. Forestry. Res.* 2008. Vol. 58, pp. 59- 64.
99. CONTRERAS, A., LUENGO, C., SANCHEZ, A. et CORRALES, J.C. The role of intramammary pathogens in dairy goats. *Livestock Production Science.* 2003. N° 79, pp. 273- 283.

100. GOMEZ-MARTIN, A., AMORES, J., PATERNA, A. et DE LA FE, C. Contagious agalactia due to *Mycoplasma* spp. in small dairy ruminants: Epidemiology and prospects for diagnosis and control. *The Veterinary Journal*. 2013.
101. BERGONIER, D., BERTHELOT, X. et POUMARAT, F. Contagious agalactia of small ruminants: Current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Rev. sci. tech. int. Epiz.* 1997. Vol. 16, n° 3, pp. 848- 873.
102. TABET, E., HOSRI, C. et ABI-RIZK, A. Prévalence et facteurs de risque de l'arthrite-encéphalite caprine virale au Liban. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 2015. Vol. 34, n° 3, pp. 1- 19.
103. SANCHEZ, A., CONTRERAS, A., CORRALES, J.C. et MARCO, J.C. Relationships between infection with caprine arthritis encephalitis virus, intramammary bacterial infection and somatic cell counts in dairy goats. *Veterinary Research*. 2001. Vol. 148, n° 23, pp. 711- 714.
104. ISSARTIAL, J. *La numération cellulaire individuelle du lait de chèvre : rôle du virus de l'arthrite encéphalite caprine (CAEV)*. Thèse de doctorat vétérinaire. Claude Bernard-LYON I, 1990.
105. LEBOEUF, A. et BELANGER, D. Epidémiologie de l'arthrite-encéphalite caprine: revue des connaissances. *Bull. Acad. Vet. Fr.* 2003. Vol. 161, n° 2, pp. 39- 42.
106. LUENGO, C., SANCHEZ, A., CORRALES, J.C., FERNANDEZ, C. et CONTRERAS, A. Influence of intramammary infection and noninfection factors on somatic cell counts in dairy goats. *Journal of Dairy Research*. 2004. Vol. 71(2), pp. 169- 174.
107. BARONE, Robert. Anatomie comparée des mammifères domestiques. In : *Anatomie comparée des mammifères domestiques*. 2ème édition. Paris : Vigot, 1990. pp. 951. ISBN 2-7114-9012-2. p449-p495
108. TREECE J.M., MORSE G.E., LEVY. Lipid Composition of Bovine Teat Canal Keratin. *Journal of Dairy Science*. Mai 1988. Vol. 71, n° 5, pp. 1389- 1385.
109. BITMAN J, WOOD DL, BRIGHT SA, MILLER RH, CAPUCO AV, ROCHE A, PANKEY JW. Lipid composition of teat canal keratin collected before and after milking from Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science*. février 1991. N° 74(2), pp. 414- 420.
110. PAULRUD, C.O. Basic Concepts of the Bovine Teat Canal. *Veterinary Research Communications*. 2005. N° 29, pp. 215- 245.
111. PASCAL RAINARD, CÉLINE RIOLLET. Review article - Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research Communications*. 2006. Vol. 37, pp. 369- 400. DOI 10.1051.
112. MOHAMED EZZAT ALNAKIP, MARCOS QUINTELA-BALUJA, KAROLA BÖHME, INMACULADA FERNÁNDEZ-NO, SONIA CAAMAÑO-ANTELO, PILLAR CALO-MATA. The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *Journal of Veterinary Medicine*. 10 novembre 2014. pp. online.
113. CORMAC J. WHELEHANA, KIERAN G. MEADEB, P. DAVID ECKERSALLC, FIONA J. YOUNGC, CLIONA O'FARRELLY. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 15 avril 2011. Vol. 140, n° 3- 4, pp. 181- 189.

114. GOLDAMMER T, ZERBE H, MOLENAAR A, SCHUBERTH HJ, BRUNNER RM, KATA SR, SEYFERT HM. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol.* janvier 2004. Vol. 11(1), pp. 174- 185.
115. PASCAL RAINARD. Review Article The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Veterinary Research Communications.* janvier 2003. Vol. 34, pp. 647- 670.
116. BURTON, JL, ET RJ ERSKINE. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice.* 2003. Vol. 19, n° 1, pp. 1- 45.
117. PAAPE, M.J., WIGGANS, G.R., BANNERMAN, D.D., THOMAS, D.L., SANDERS, A.H., CONTRERAS, A., MORONI, P. et MILLER, R.H. Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Ruminant Research.* 2007. Vol. 68, n° 1- 2, pp. 114- 125.
118. PAUL, William E. *Fundamental Immunology.* In : . Raven Press, 1989. pp. 98- 99. ISBN 0-88167-491-5.
119. M. J. PAAPE et A. V. CAPUCO. Cellular Defense Mechanisms in the Udder and Lactation of Goats. *Journal of Animal Science.* 75. 1997. pp. 556- 565.
120. S.C. NICKERSON, L.M. SORDILLO. Role of macrophages and multinucleate giant cells in the resorption of corpora amylacea in the involuting bovine mammary gland. *Cell Tissue Research.* 1985. Vol. 240, pp. 394- 397.
121. OUTERIDGE P. M., LEE C. S. Cellular immunity in the mammary gland with particular reference to T, B lymphocytes and macrophages. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 1981. Vol. 137, pp. 513- 534.
122. LORRAINE M. SORDILLO et KATIE L. STREICHER. Mammary Gland Immunity and Mastitis Susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.* Vol7, No.2. avril 2002.
123. K. PERSSON, I. LARSSON et C. HALLÉN SANDGREN. Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vivo and in vitro. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* juillet 1993. Vol. 37, n° 2, pp. 99- 112.
124. CRAVEN N. Generation of neutrophil chemoattractants by phagocytosing bovine mammary macrophages. *Research in Veterinary Science.* 1983. Vol. 35(3), pp. 310- 317.
125. SHUSTER, DE, ME KEHRLI JR, P RAINARD, ET M PAAPE. Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli.* *Infection and Immunity.* 1997. Vol. 65, n° 8, pp. 3286- 3292.
126. POLITIS I., ZHAO X., MCBRIDE B. W., BURTON J. H. Function of bovine mammary macrophages as antigen-presenting cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 1992. Vol. 30(4), pp. 399- 410.
127. FITZPATRICK J. L., CRIPPS P. J., HILL A. W., BLAND P. W., STOKES C. R. MHC class II expression in the bovine mammary gland. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 1992. Vol. 32, n° 1- 2, pp. 13- 23.
128. DROKE, E.A., PAAPE, M.J. et DI CARLO, A.L. Prevalence of High Somatic Cell Counts in Bulk Tank Goat Milk. *Journal of Dairy Science.* 1993. N° 76, pp. 1035- 1039.

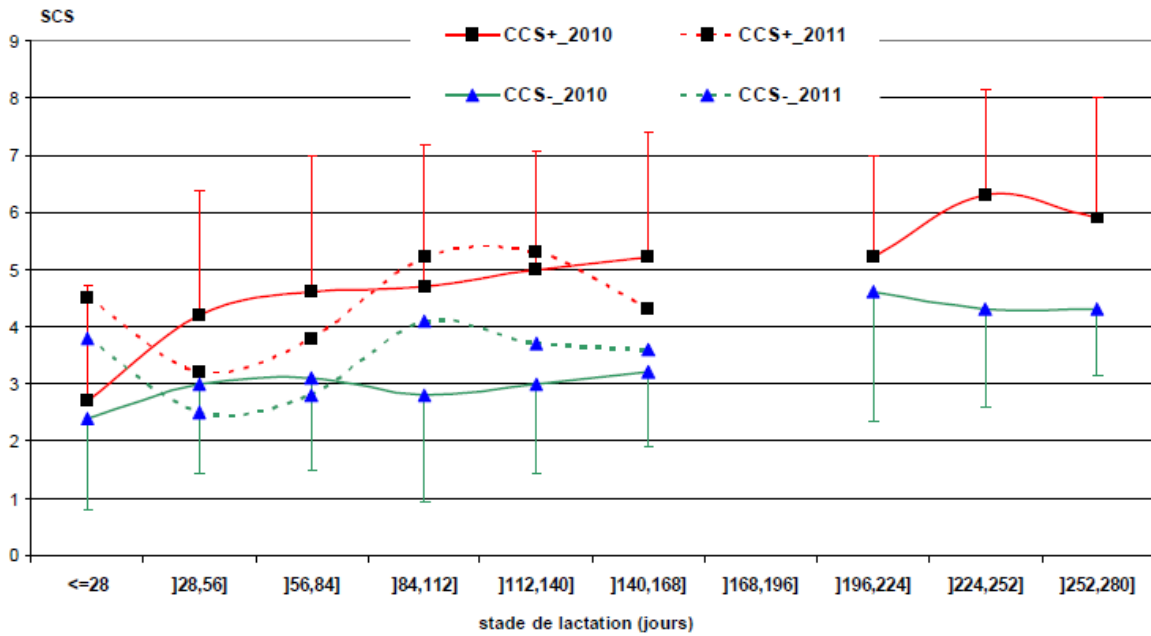
129. PAAPE, M J. et JALIL MEHRZADXIN ZHAOJOHANN DETILLEUXCHRISTIAN BURVENICH. Defense of the Bovine Mammary Gland by Polymorphonuclear Neutrophil Leukocytes. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. avril 2002. pp. 109- 121.
130. PAAPE, MJ, DD BANNERMAN, X ZHAO, ET J W LEE. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. *Veterinary Research*. 2003. Vol. 34 (5), pp. 259- 277.
131. FROST AJ, BROOKER BE, HILL AW. The effect of Escherichia coli endotoxin and culture filtrate on the lactating bovine mammary gland. *Austr Vet Journal*. 61. 1984. pp. 77- 82.
132. BRINKMANN, V, U REICHARD, C GOOSMANN, B FAULER, Y UHLEMANN, DS WEISS, Y WEINRAUCH, ET et A ZYCHLINSKY. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 303 (5663). New York, 2004. pp. 1532- 1535.
133. CAPUCO A.V., PAAPE M.J., NICKERSON S.C. In vitro study of polymorphonuclear leukocyte damage to mammary tissues of lactating cows. *American Journal of Research*. 1986. Vol. 47, pp. 663- 668.
134. LEDBETTER T.K., PAAPE M.J., DOUGLASS L.W. Cytotoxic effects of peroxynitrite, polymorphonuclear neutrophils, free-radical scavengers, inhibitors of myeloperoxidase, and inhibitors of nitric oxide synthase on bovine mammary secretory epithelial cells. *American Journal of Research*. 2001. Vol. 62, pp. 286- 293.
135. DALEY, M., OLDHAM, E. et WILLIAMS, T. Quantitative and qualitative properties of host polymorphonuclear cells during experimentally induced Staphylococcus aureus mastitis in cows. *American Journal of Veterinary Research*. 1991. Vol. 3, n° 52, pp. 474- 479.
136. RIOLLET, C, P RAINARD, ET B POUTREL. Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2000. Vol. 480, pp. 247- 258.
137. ISMAIL H.I., HASHIMOTO Y., KON Y., OKADA K., DAVIS W.C. et IWANAGA T. Lymphocyte subpopulations in the mammary gland of the goat. *Veterinary Immunology and Innunopathology*. 1996. Vol. 52, pp. 201- 212.
138. TAYLOR B.C., DELLINGER J.D., CULLOR J.S. et STOTT J.L. Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8+. *Cell Immunology*. 1994. Vol. 156, pp. 245- 253.
139. TAYLOR B.C., KEEFE R.G., DELLINGER J.D., NAKAMURA Y., CULLOR J.S. et STOTT J.L. T cell populations and cytokine expression in milk derived from normal and bacteria-infected bovine mammary glands. *Cell Immunology*. 1997. Vol. 182, pp. 68- 76.
140. SHAFER-WEAVER K.A., PIGHETTI G.M. et SORDILLO L.M. Diminished mammary gland lymphocyte functions parallel shifts in trafficking patterns during the postpartum period. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1996. Vol. 212, pp. 271- 280.
141. RIOLLET C., RAINARD P. et POUTREL B. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic Staphylococcus aureus infection. *Journal of Dairy Science*. 2001. Vol. 84, pp. 1077- 1084.

142. LEITNER G., YADLIN B. et GLICKMAN A. Systemic and local immune response of cows to intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. *Research in Veterinary Science*. 2000. Vol. 69, pp. 181- 184.
143. DGAL. *Note de service DGAL/SDSSA/2014-599*. 21 juillet 2014.
144. DULIN, A.M., PAAPE, M.J., SCHULTZE, W.D. et WEINLAND, B.T. Effect of Parity, Stage of Lactation, and Intramammary Infection on Concentration of Somatic Cells and Cytoplasmic Particles in Goat Milk. *Journal of Dairy Science*. 1983. Vol. 66, pp. 2426- 2433.
145. SCHWARZ, D., DIESTERBECK, U.S., KÖNIG, S., BRÜGEMANN, K., SCHLEZ, K., ZSCHÖCK, M., WOLTER, W. et CZERNY, C.P. Flow cytometric differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science*. 2011. Vol. 94, n° 10, pp. 5033- 5044.
146. WILSON, D.J., STEWART, K.N. et SEARS, P.M. Effects of stage of lactation, production, parity and season on somatic cell counts in infected and uninfected dairy goats. *Small Ruminant Research*. Vol. 16(2), pp. 165- 169.
147. ROTA, A.M., GONZALO, C., RODRIGUEZ, P.L., ROJAS, A.I., MARTIN, L. et TOVAR, J.J. Somatic cell types in goats milk in relation to total cell count, stage and number of lactation. *Small Ruminant Research*. 1993. Vol. 12, pp. 89- 98.
148. ZENG, S.S., ESCOBAR, E.N. et POPHAM, T. Daily variations in somatic cell count, composition, and production of Alpine goat milk. *Small Ruminant Research*. 1997. Vol. 26(3), pp. 253- 260.
149. JIMENEZ-GRANADO, R., RODRIGUEZ-ESTEVEZ, V., MORANTES, M., ARCE, C. et SANCHEZ-RODRIGUEZ, M. Relationship between reproductive parameters and somatic cell count in dairy goats. *Reprod. Domest. Anim.* 47(3). 2012. pp. 90- 123.
150. MCDUGALL, S. et VOERMANS, M. Influence of estrus on somatic cell count in dairy goats. *Journal of Dairy Science*. 2002. Vol. 85(2), pp. 378- 383.
151. MARTINEZ, B. *El recuento de células somáticas en la leche de cabra, factores de variación y efecto sobre la producción y composición de la leche*. Thèse doctorale. Spain : Universidad Politécnica de Valencia, 2000.
152. FEDELE, V., CLAPS, S. et RUBINO, R. Effect of feeding systems on somatic cells count in goats. *Wageningen Pers EAAP*. 1996. Vol. 77, pp. 167- 172.
153. SANCHEZ, J., MONTES, P., JIMENEZ, A. et ANDRES, S. Prevention of clinical mastitis with barium selenate in dairy goats from a selenium-deficient area. *Journal of Dairy Science*. 2007. Vol. 90, n° 5, pp. 2350- 2354.
154. GRIFFIN, T.K., DODD, F.H., NEAVE, F.K., WESTGARTH, D.R. et KINGWILL, R.G. A method of diagnosing intramammary infection in dairy cows for large experiments. *Journal of Dairy Research*. 1977. Vol. 44, pp. 25- 45.
155. KALOGRIDOU-VASSILIADOU, D. et MANOLKIDIS, K. Somatic cell counts in relation to infection status of the goat udder. *Journal of Dairy Research*. 1992. Vol. 59, pp. 21- 28.

156. MIN, B.R., TOMITA, G. et HART, S.P. Effect of subclinical intramammary infection on somatic cell counts and chemical composition of goats' milk. *Journal of Dairy Research*. 2007. N° 74, pp. 204- 210.
157. BAGNICKA, E., WINNICKA, A., RZEWUSKA, M., STRZALKOWSKA, N., KOSCIUCZUK, E., PRUSAK, B., KABA, J., HORBANCZUK, J. et KRZYZEWSKI, J. Relationship between somatic cell count and bacterial pathogens in goat milk. *Small Ruminant Research*. 2011. N° 100, pp. 72- 77.
158. MORONI, P., PISONI, G., RUFFO, G. et BOETTCHER, P.J. Risk factors for intramammary infections and relationship with somatic-cell counts in Italian dairy goats. *Preventive Veterinary Medicine*. 2005. N° 69, pp. 163- 173.
159. RAYNAL-LJUTOVAC, K., PIRISI, A., DE CREMOUX, R. et GONZALO, C. Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects. *Small Ruminant Research*. 2007. N° 68, pp. 126- 144.
160. DE HAAS, Y., VEERKAMP, R.F., BARKEMA, H.W., GRÖHN, Y.T. et SCHUKKEN, Y.H. Associations Between Pathogen-Specific Cases of Clinical Mastitis and Somatic Cell Count Patterns. *Journal of Dairy Science*. 2004. Vol. 85, pp. 95- 105.
161. UPADHYAYA, T.N. et RAO, A.T. Diagnosis and threshold values of subclinical mastitis in goats. *Small Ruminant Research*. 1993. N° 12, pp. 201- 210.
162. PAAPE, M.J., POUTREL, B., CONTRERAS, A., MARCO, J.C. et CAPUCO, A.V. Milk Somatic Cells and Lactation in Small Ruminants. *Journal of Dairy Science*. 2001. N° 84, pp. 237- 244.
163. SRINIVASAN, M. et LUCEY, A. Effects of added plasmin on the formation and rheological properties of rennet-induced milk gels. *Journal of Dairy Science*. 2002. N° 85, pp. 1070- 1078.
164. BARRÓN-BRAVO, O.G., GUTIÉRREZ-CHÁVEZ, A.J., ÁNGEL-SAHAGÚN, C.A., MONTALDO, H.H., SHEPARD, L. et VALENCIA-POSADAS, M. Losses in milk yield, fat and protein contents according to different levels of somatic cell count in dairy goats. *Small Ruminant Research*. 2013. Vol. 113, pp. 421- 431.
165. DOSOGNE, H., VANGROENWEGHE, F., MEHRZAD, J., MASSART-LEËN, A.M. et BURVENICH, C. Differential Leukocyte Count Method for Bovine Low Somatic Cell Count Milk. *Journal of Dairy Science*. 2003. Vol. 86, pp. 828- 834.
166. POOT, M., GIBSON, L. et SINGER, V. Detection of apoptosis in live cells by Mito Tracker (TM) Red CMXRos and SYTO dye flow cytometry. *Cytometry*. 1997. Vol. 4, n° 27, pp. 358- 364.
167. FREY, T. Nucleic acid dyes dor detection of apoptosis in live cells. *Cytometry*. 1995. N° 21, pp. 265- 274.
168. YANG, S., LIN, S., KELEN, G.D., QUINN, T.C., DICK, J.D., GAYDOS, C.A. et ROTHMAN, R.E. Quantitative Multiprobe PCR Assay for Simultaneous Detection and Identification to Species Level of Bacterial Pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 2002. Vol. 40, n° 9, pp. 3449- 3454.
169. OUZROUT, R. et LERONDELLE, C. Les lymphocytes du lait de brebis Infectéees par le virus Maedi-CAEV au moment de l'agnelage. *Ann. Rech. Vet.* 1992. Vol. 23, n° 3, pp. 331.

170. PAAPE, M.J., SHAFER-WEAVER K.A., CAPUCO, A.V., VAN OOSTVELDT, K. et BURVENICH, C. Immune Surveillance of Mammary Tissue by Phagocytic Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2000. Vol. 480, pp. 259- 277.
171. BRAND, B., HARTMANN, A., REPSILBER, D., GRIESBECK-ZILCH, B., WELLNITZ, O., KUHN, C., PONSUKSILI, S., MEYER, HHD. et SCHWERIN, M. Comparative expression profiling of E. coli and S. aureus inoculated primary mammary gland cells sampled from cows with different genetic predispositions for somatic cell score. *Genet Sel Evol*. 2011. pp. 24- 40.
172. KOOP, G., VAN WERVEN, T., SCHUILING, H.J. et NIELEN, M. The effect of subclinical mastitis on milk yield in dairy goats. *Journal of Dairy Science*. 2010. Vol. 93, pp. 5809- 5817.
173. MANLONGAT, N., YANG, T.J., HINCKLEY, L.S., BENDEL, R.B. et KRIDER, H.M. Physiologic-Chemoattractant-Induced Migration of Polymorphonuclear Leukocytes in Milk. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998. Vol. 5, pp. 375- 381.
174. LERONDELLE, C. et POUTREL, B. Characteristics of Non-clinical Mammary Infections of Goats. *Ann. Rech. Vet*. 1984. Vol. 15, n° 1, pp. 105- 112.
175. CREMONESI, P., CAPOFERRI, R., PISONI, G., DEL CORVO, M., STROZZI, F., RUPP, R., CAILLAT, H., MODESTO, P., MORONI, P., WILLIAMS, J.L., CASTIGLIONI, B. et STELLA, A. Response of the goat mammary gland to infection with Staphylococcus aureus revealed by gene expression profiling in milk somatic and white blood cells. *BCM Genomics*. 2012. Vol. 13, pp. 540.
176. SEARS, P.M., SMITH, B.S., ENGLISH, P.B., HERER, P.S. et GONZALEZ, R.N. Shedding Pattern of Staphylococcus aureus from Bovine Intramammary Infections. *Journal of Dairy Science*. 1990. Vol. 73, pp. 2785- 2789.
177. DEVERRIERE, B. *Reproduction expérimentale de mammites à Staphylococcus aureus chez la brebis : Comparaison de lignées génétiques divergentes pour les comptages cellulaires*. Thèse de doctorat vétérinaire. Toulouse : Paul Sabatier, 2007.
178. GREGORI, G. La cytométrie en flux : Principes. . Laboratoire de Microbiologie Géochimie et d'Ecologie Marines CNRS UMR 6117.
179. ZHAO, Yanqing, LIU, Hui, ZHAO, Xuanduo, GAO, Yang, ZHANG, Miaotao et CHEN, Dekun. (25) Prevalence and pathogens of subclinical mastitis in dairy goats in China. *Tropical Animal Health and Production*. février 2015. Vol. 47, n° 2, pp. 429- 435.
180. GUILLOU, T. *Qualité microbiologique et cellulaire du lait caprin: étude descriptive de 20 élevages du Centre-Ouest de la France*. Thèse de doctorat vétérinaire. Faculté de Médecine, Nantes, 2011.
181. PARKIN, J. et COHEN, B. An Overview of the Immune System. *The Lancet*. 2001. Vol. 357, pp. 1777- 1789.

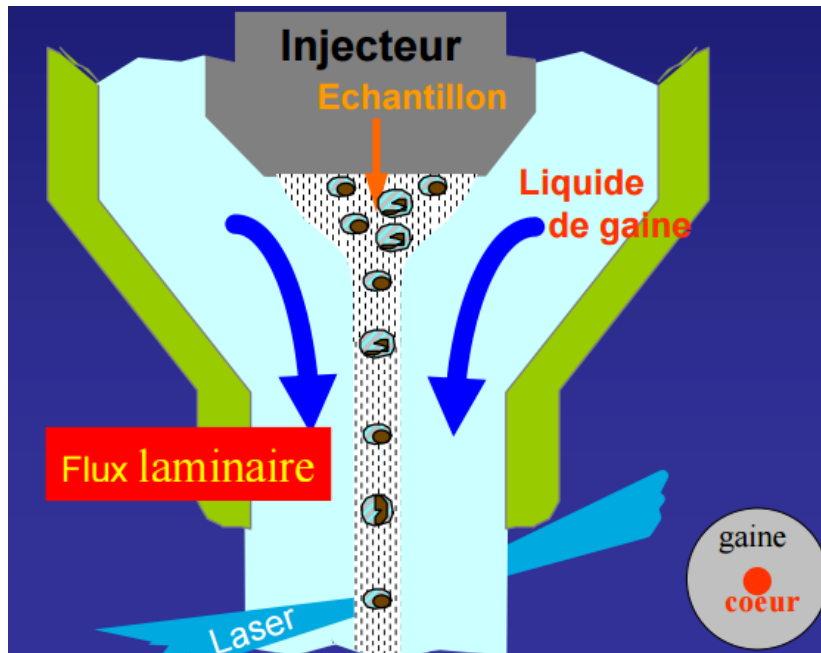
Annexes



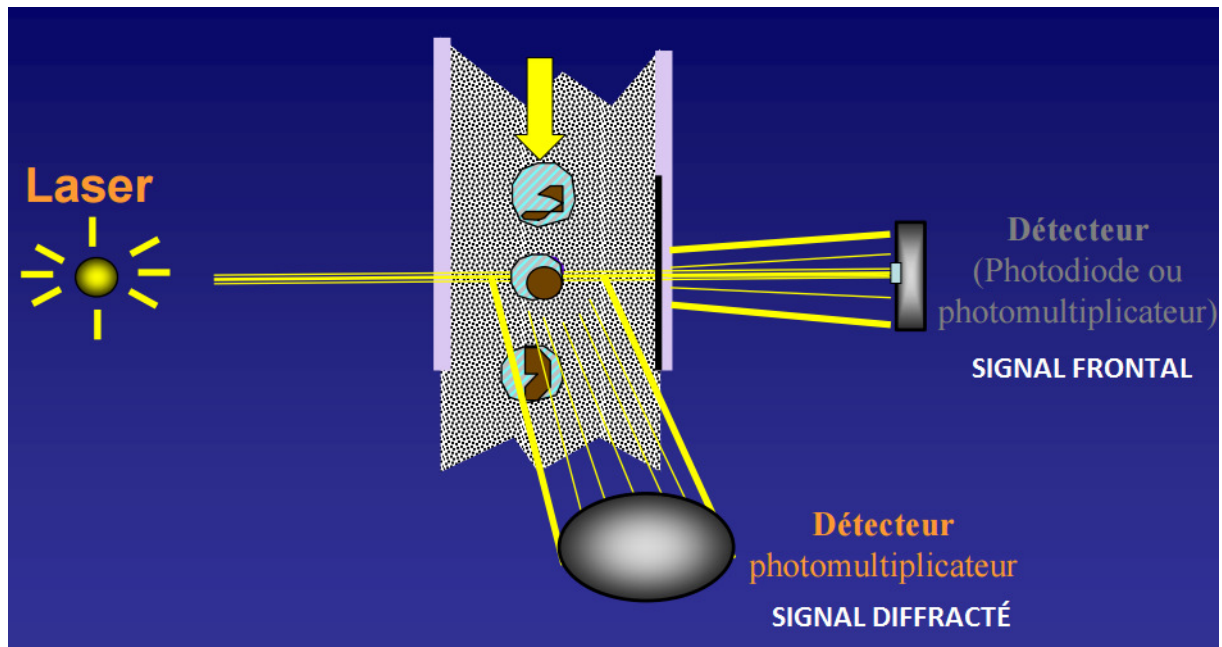
Annexe 1 : Evolution du SCS hemi-mamelle (moyennes et écart-types) au cours de la lactation selon la lignée et la campagne (21)

CMT	Visualisation
0	Aucune réaction
T	Légère floculation qui disparaît à l'agitation
1	Léger précipité sans formation de gel, parfois réversible à l'agitation
2	Gélification immédiate se déplaçant en masse à l'agitation
3	Gel de surface convexe, adhérent au fond de la coupelle

Annexe 2 : Critère de notation du CMT (31)



Annexe 3 : Principe de focalisation hydrodynamique par un liquide vecteur pour réaliser une cytométrie en flux (178)



Annexe 4 : Principe de détection du signal lumineux frontal et de la fluorescence latérale (178)

AUTEUR	PAYS	CP	E	POSITIFS (%)			STAPH		STREP	CORYN	BG-		MYC	A
				HM	An	Ech	SCN	SCP			EB	NEB		
HUNTER, 1984	GB	250	-	25,0	-	-	83,5	12,4	3,3	-	0,8	-	X	-
LERONDELLE ET POUTREL, 1984	France	1217	10	31,0	-	-	76,3	17,7	5,7	-	-	-	X	0,3
BINDER, 1986	All.	19	1	-	-	50,2	63,8	24,7	9,8	-	-	-	X	1,7
MANSER, 1986	GB	85	5	36,0	47,0	-	80,0	16,0	2,0	-	-	2,0	X	-
BARCELLOS ET AL., 1987	Brésil	84	4	46,5	-	-	8,8	42,6	1,5	-	-	-	X	47,1*
EAST ET AL., 1987	USA	2522	16	-	24,0	-	12,9	72,6	1,2	-	8,3	-	5,0	-
GUHA ET AL., 1989	Inde	64	-	37,5	-	-	58,3	-	33,3	-	8,3	-	X	--
VIHAN, 1989	Inde	191	2	15,2	19,4	-	55,0	16,3	6,4	-	9,5	6,4	6,4	-
MAISI, 1990*	Finlande	39	-	20,2	-	-	95,9	4,1	-	-	-	-	X	-
RYAN ET GREENWOOD, 1990	Australie	448	4	16,9	-	--	78,7	5,9	3,6	-	11,8	-	X	-
KALOGRIDOUVASSILIADOU, 1991	Grèce	90	3	67,0	-	-	44,5	17,2	1,9	1,5	4,3	0,7	X	29,9*
VALLE ET AL., 1991*	Espagne	133	-	-	35,3	-	78,6	21,4	-	-	-	-	X	-
CONTRERAS ET AL., 1995	Espagne	188	10	18,0	30,0	-	71,0	-	1,0	12,0	3,0	-	9,0	4,0
DE CREMOUX, 1995 (82)	France	144	8	-	-	46,9	95,2	2,4	1,1	-	0,8	-	-	0,2
DEINHOFER ET PERNTHANER, 1995	Autriche	204	3	-	-	11,3	76,1	13,2	9,0	1,7	-	-	-	-
BOSCOS ET AL., 1996	Grèce	93	6	29,0	-	-	61,1	18,5	9,3	-	-	-	-	11,1
FERRER ET AL., 1996	Espagne	-	-	-	-	-	43,2	13,5	-	-	32,0	-	X	11,3
KOSEV ET AL., 1996	Bulgarie	-	-	-	-	30,3	26,2	57,0	-	-	6,7	-	X	10,1
POUTREL ET AL., 1996	France	1060	8	47,0	-	63,6	95,1	2,6	1,0	-	0,9	-	X	0,4
VIHAN, 1996	Inde	46	1	28,3	-	-	26,9	34,6	15,4	-	23,0	-	-	-
CONTRERAS ET AL., 1997	Espagne	131	4	6,5	-	9,0	71,4	6,0	-	8,0	2,4	7,1	X	5,1
SANCHEZ ET AL., 1999	Espagne	324	18	22,0	34,0	-	70,0	-	-	24,0	3,0	-	-	3,0
SANCHEZ ET AL., 1999	Espagne	653	8	7,2	-	-	76,6	-	4,3	2,1	3,1	7,4	6,4	-

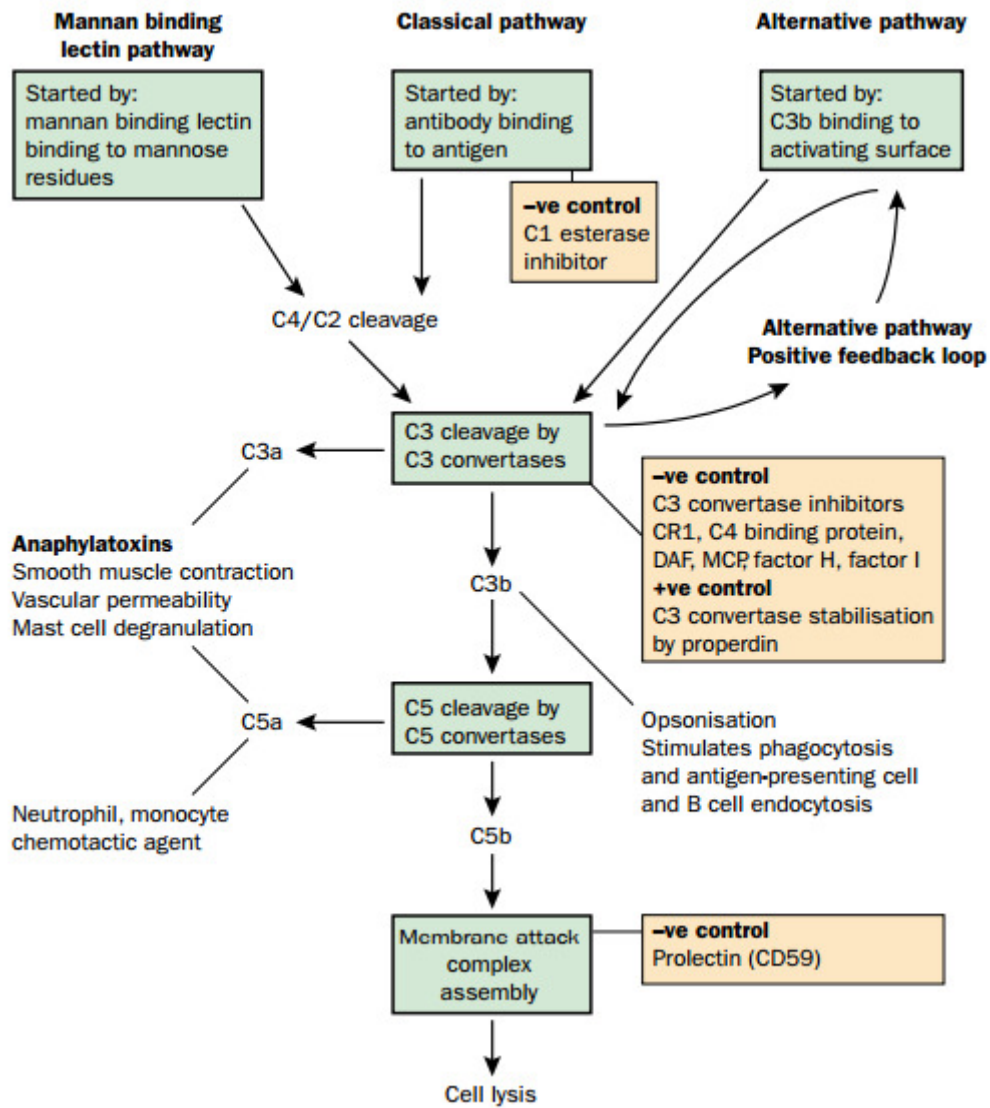
WHITE ET HINCKLEY, 1999	USA	-	-	36,4	-	-	68,1	19,6	7,3	-	2,8	2,2	X	-
MERCIER ET AL., 1998	France	230	5	52,5	-	-	79,9	7,1	2,1	-	-	-	X	11,0
MCDUGALL ET AL., 2002 (23)	USA	110	6	35,5	27,3	-	66,7	10,3	5,2	7,7	-	5,2	-	5,6
LEITNER ET AL., 2004* (43)	Israël	500	10	52,0	-	-	85,0	7,4	-	-	-	-	X	7,6
MORONI ET AL., 2005*	Italie	305	5	40,2	-	-	80,2	6,1	-	-	-	-	X	-
LEITNER ET AL., 2007	Israël	377	3	28,8	-	-	62,2	32,7	-	5,1	-	-	X	-
MIN ET AL., 2007	USA	35	1	26,2	-	-	43,7	35,4	-	-	5,4	12,4°	X	-
MCDUGALL ET AL., 2010	Nlle-Zde	106	4	20,4	-	-	39,5	4,7	2,3	53,5	-	-	-	-
KOOP ET AL. 2012 (83)	Pays-Bas	530	5	-	-	40,3	30,8	5,2	0,2	57,6	0,2	-	-	6,0
MAROGNA ET AL. 2012 (90)	Italie	1388	31	-	22,7	-	59,8	13,7	9,7	-	1,6	4,1	4,7	-
ZHAO ET AL. 2014 (179)	Chine	683	7	-	45,8	-	59,5	15,2	11,0	-	11,4	-	-	2,8
MC DOUGALL ET AL. 2014 (84)	Nlle-Zde	-	18	-	-	23,3	58,0	3,8	2,4	31,5	0,7	-	-	3,5
GELASAKIS ET AL. 2016 (93)	Grèce	590	4	-	-	16,5	50,2	34,5	5,3	-	6,1	-	1,2	2,7

Cp : nombre de chèvres ; E : nombre d'élevage ; HM : héli-mamelle ; An : animal ; Ech : échantillon ; Staph : pourcentage de staphylocoques ; Strep : pourcentage de streptocoques ; Cory : pourcentage de corynébactéries ; B G- : pourcentage de bactéries gram négatif ; EB : pourcentage d'entérobactéries ; NEB : pourcentage de bactéries gram négatif autres que EB ; Myc : pourcentage de mycoplasmes ; A : pourcentage d'autres bactéries ; x : recherche de mycoplasmes non effectuée.

* : seuls les staphylocoques ont été recherchés ou ont été pris en compte ; + : tous les germes sont des Bacillus ; ° : Pseudomonas.

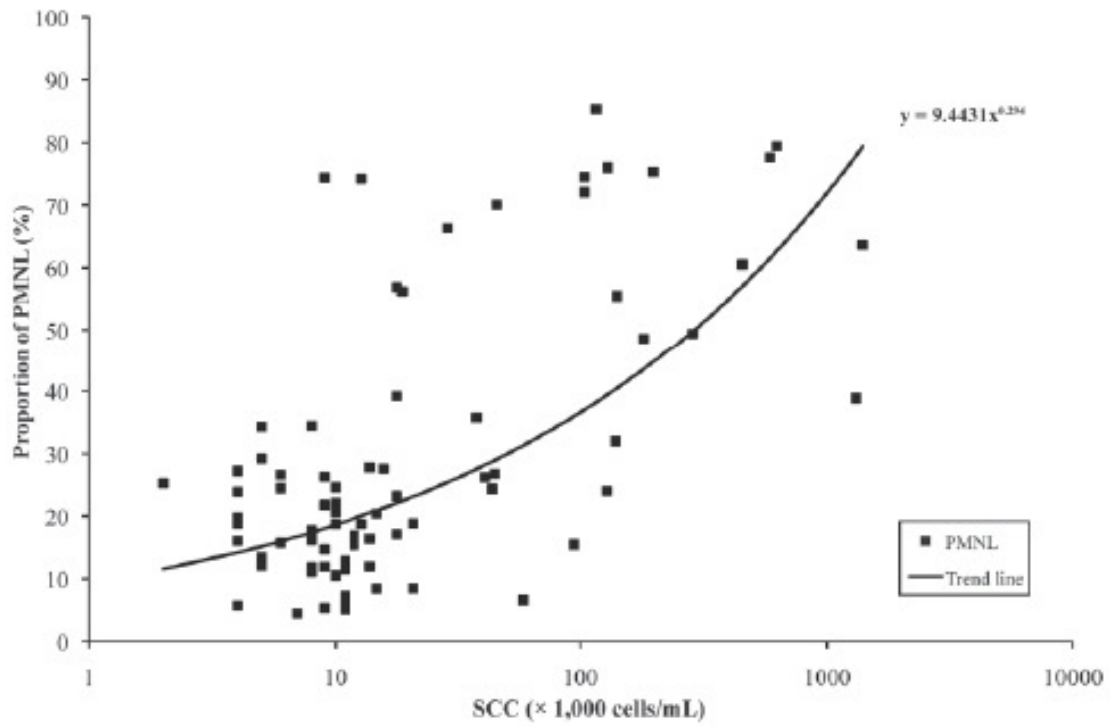
GB : Grande-Bretagne, All. : Allemagne, USA : Etats-Unis, Nlle-Zld : Nouvelle-Zélande.

Annexe 5 : Prévalence et étiologie des IIM subcliniques de la chèvre laitière. Extrait de (180) complété

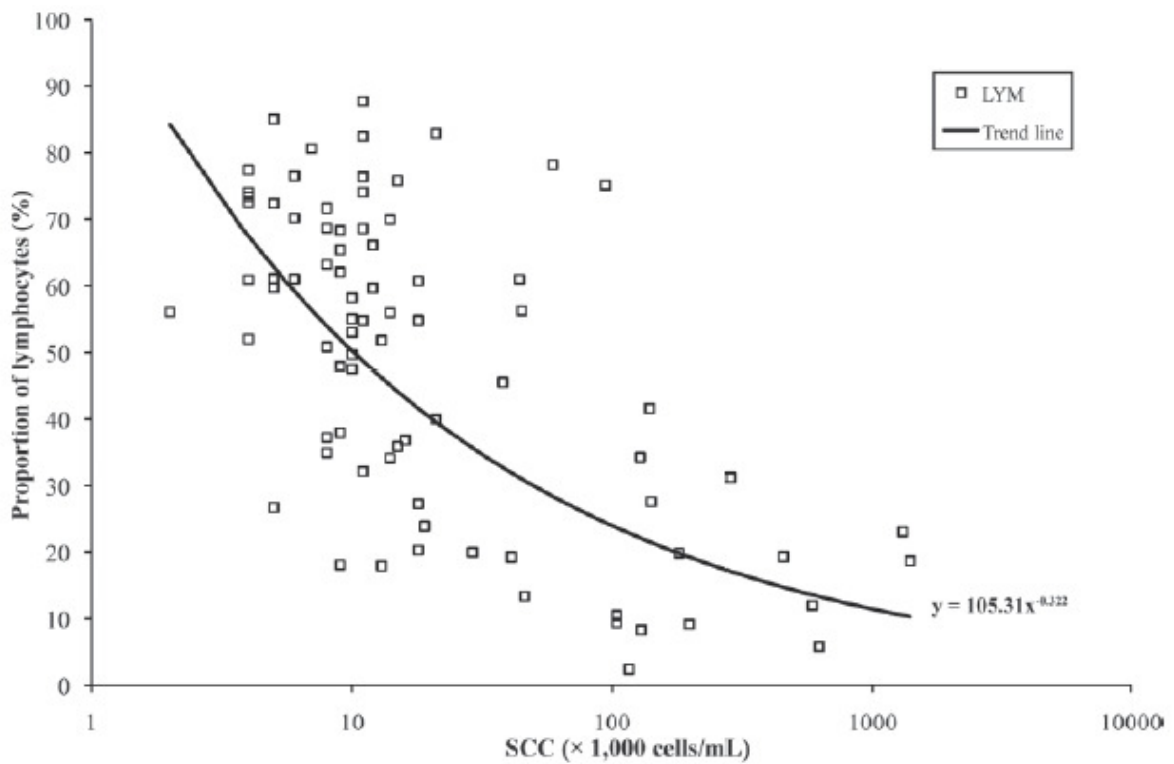


Annexe 6 : Voies d'activation du complément. (181)

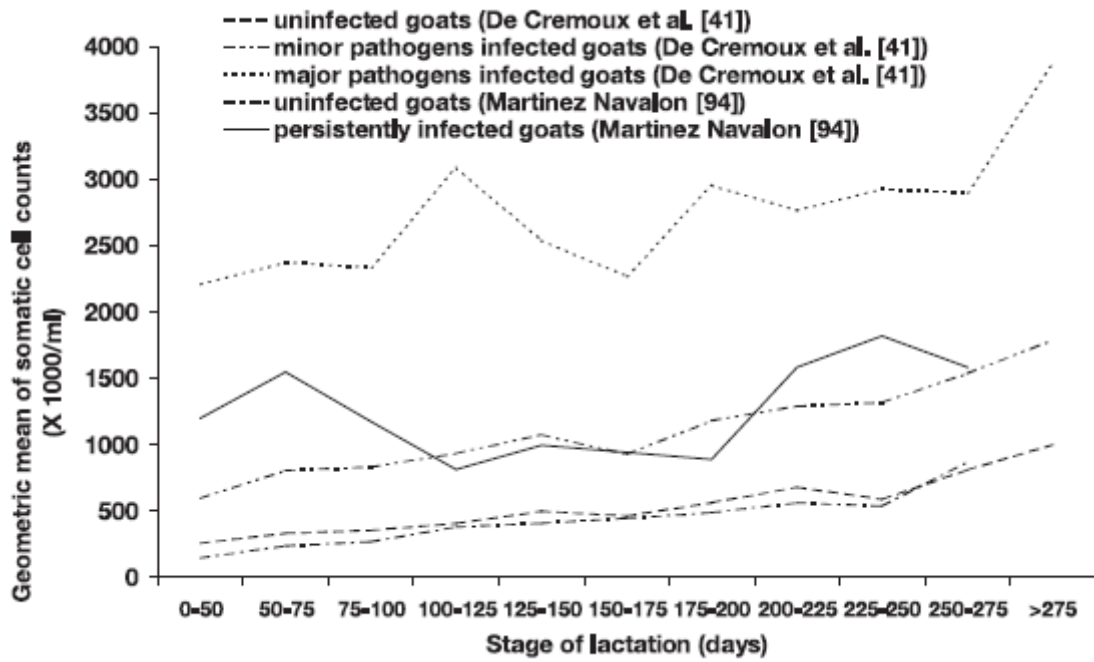
En orange ; protéines régulatrices, en vert : composés des voies d'activation



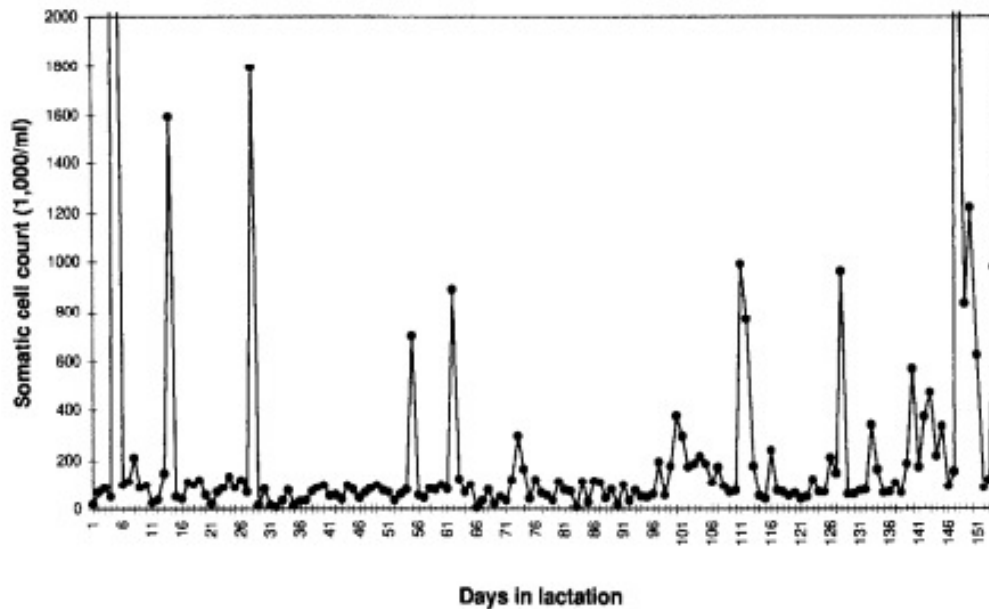
Annexe 7 : CCS en fonction du pourcentage de neutrophiles avec la courbe de tendance associée. Chaque point représente un quartier (145)



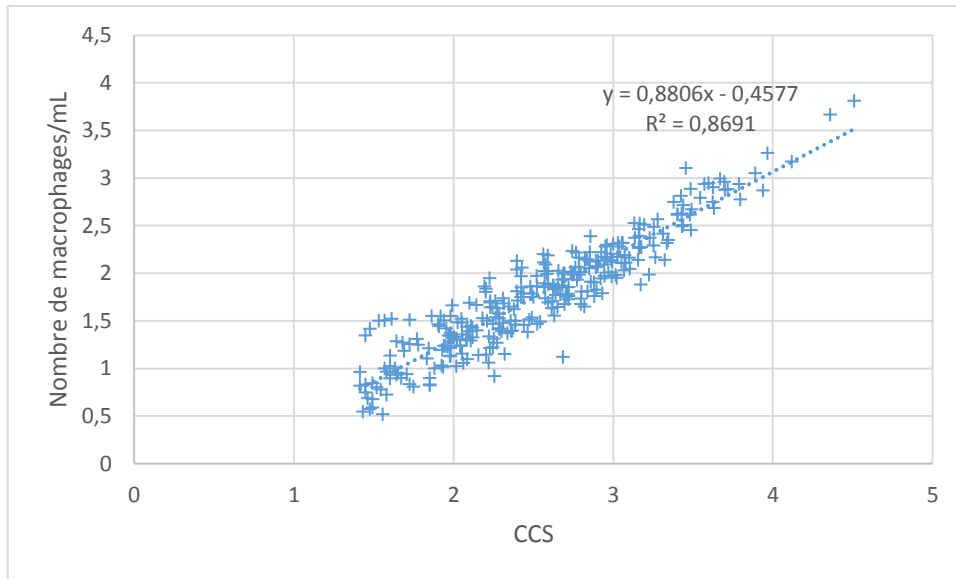
Annexe 8 : CCS en fonction du pourcentage de neutrophile avec la courbe de tendance associée. Chaque point représente un quartier (145)



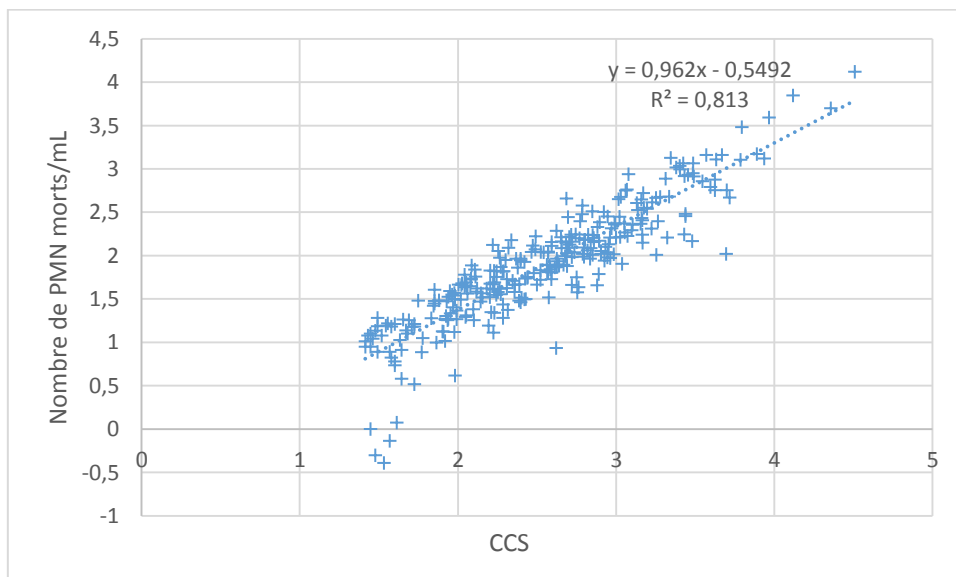
Annexe 9 : Effet du stade de lactation sur la CCS individuelle en fonction du statut infectieux de la mamelle des chèvres (1)



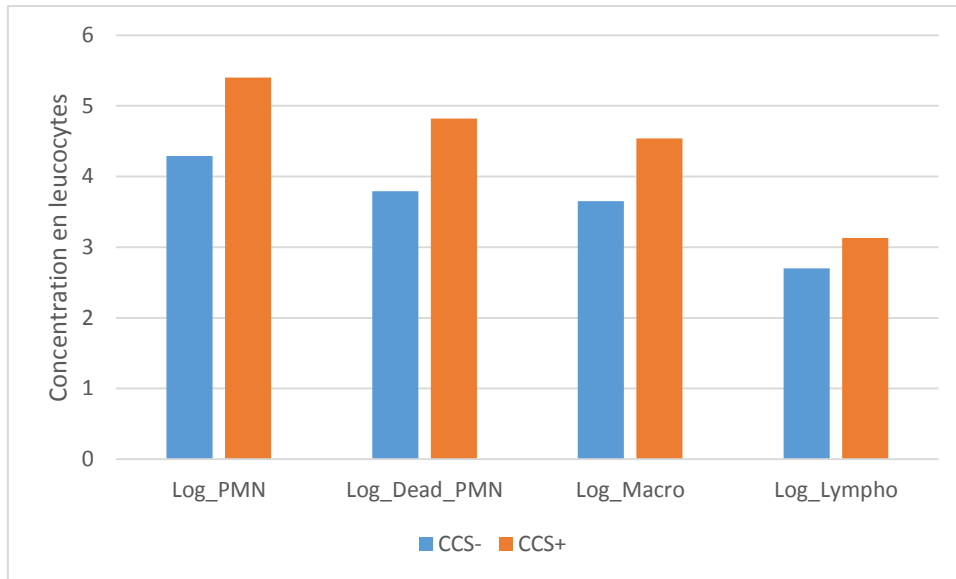
Annexe 10 : Exemple de variation journalière de SCC du lait d'une chèvre Alpine (148)



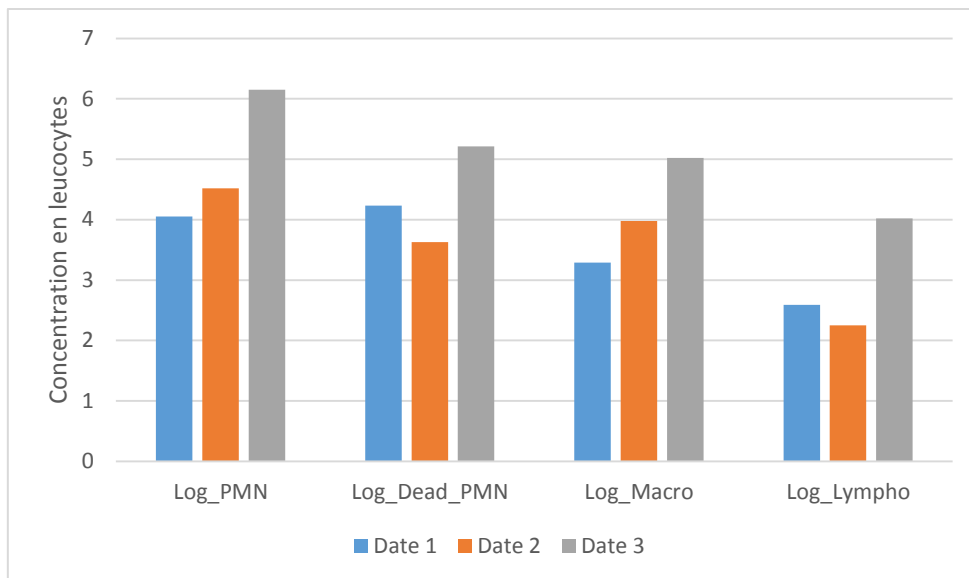
Annexe 11 : Concentration en macrophages en fonction de la CCS à l'échelle logarithmique avec la courbe de tendance associée



Annexe 12 : Concentration en PMN morts en fonction de la CCS à l'échelle logarithmique avec la courbe de tendance associée



Annexe 13 : Effet de la lignée sur les comptages des différents types de leucocytes



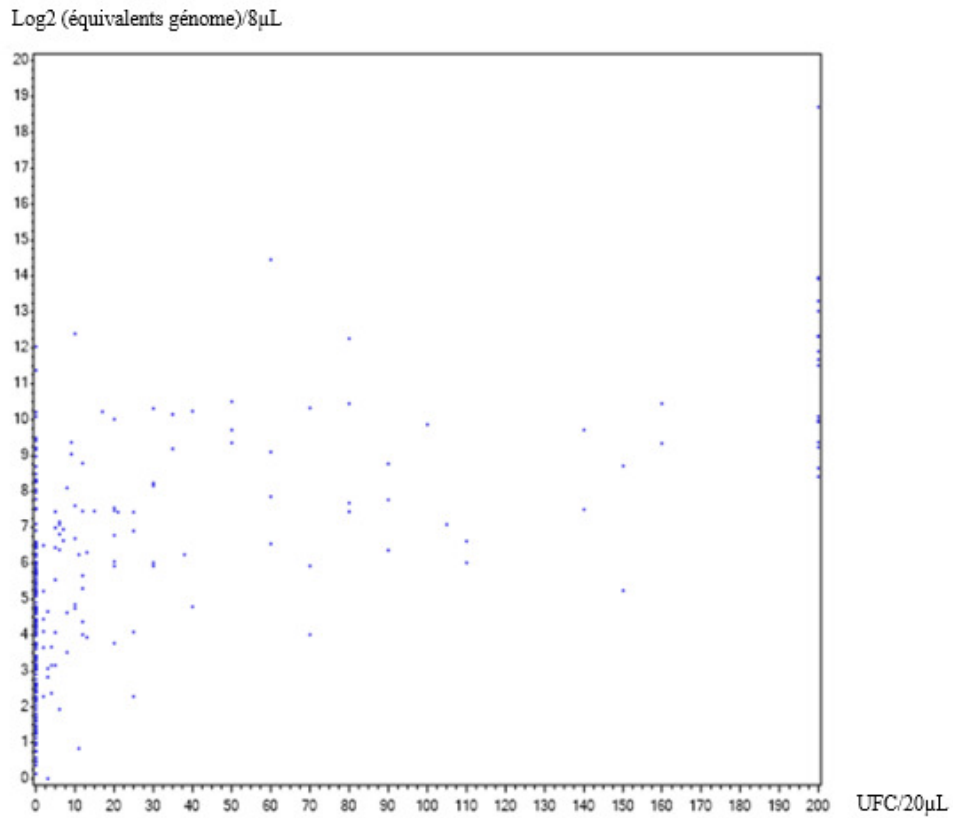
Annexe 14 : Effet de la date sur les comptages des différents types de leucocytes

catégories	PMN	Dead_PMN	Macro	Lympho
cat 1-2	<.0001	<.0001	<.0001	0.5241
cat 1-3	0.0538	0.0345	0.0044	0.4339
cat 1-4	0.0081	<.0001	0.4907	0.0208
cat 1-5	<.0001	0.0005	<.0001	<.0001
cat 1-6	0.0001	0.8977	<.0001	0.0001
cat 2-3	<.0001	0.0438	<.0001	0.9857
cat 2-4	0.1578	0.0108	0.0010	0.6034
cat 2-5	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
cat 2-6	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
cat 3-4	<.0001	<.0001	0.0007	0.0954
cat 3-5	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
cat 3-6	0.0401	0.0330	0.1798	<.0001
cat 4-5	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
cat 4-6	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
cat 5-6	0.0027	0.0016	0.0008	0.2560

Annexe 15 : Tableau de significativité des différences entre les catégories de la Figure 12

	CCS +	CCS -
Sterile	24,34	24,01
<i>S.epidermidis</i>	5,59	3,29
<i>S.caprae</i>	1,32	4,28
<i>Bacillus</i>	2,63	2,30
<i>S.hyicus</i>	2,96	1,64
<i>S.xylosus</i>	2,30	1,97
<i>S.chromogenes</i>	1,97	1,32
<i>S.aureus</i>	2,96	/
<i>S.lugdunensis</i>	2,30	0,33
<i>S.capitis</i>	0,99	0,99
<i>S.cohnii</i>	1,32	0,33
<i>S.lentus</i>	0,66	0,66
<i>S.simulans</i>	1,32	/
<i>Micrococcus</i>	0,33	0,66
<i>S.hominis</i>	0,33	0,66
<i>S.warneri</i>	0,66	0,33
<i>Aerococcus</i>	/	0,66
<i>Coryné.</i>	/	0,66
<i>S.sciuri</i>	0,33	0,33
<i>Strepto.faecium</i>	0,66	/
<i>E.coli</i>	0,33	/
<i>Strepto.acidominimus</i>	0,33	/
<i>S.saprophyticus</i>	/	0,33
EFFECTIF	166	138

Annexe 16 : Répartition en pourcentage des isolats selon chaque lignée par rapport à la totalité des échantillons



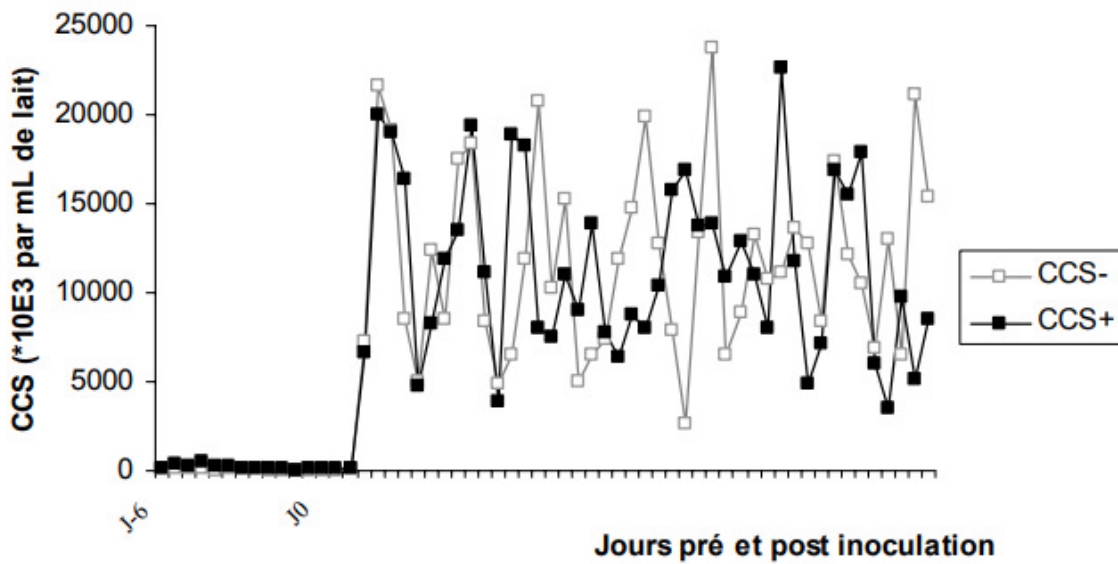
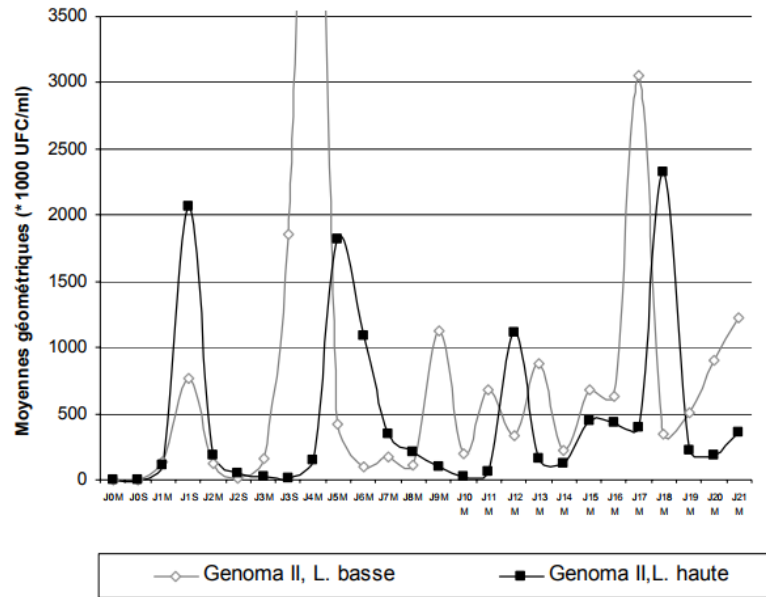
Annexe 17 : Comparaison des données obtenues à l'aide des deux méthodes bactériologiques

catégories	PMN	Dead_PMN	Macro	Lympho
cat 1-2	0.5339	0.0693	0.9875	0.0167
cat 1-3	<.0001	0.0331	0.0026	0.4005
cat 1-4	<.0001	0.0009	<.0001	0.0060
cat 2-3	<.0001	<.0001	0.0011	0.0008
cat 2-4	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
cat 3-4	0.0007	0.0258	<.0001	0.0204

Annexe 18: Tableau de significativité des différences entre les catégories de la Figure 19

catégories	PMN	Dead_PMN	Macro	Lympho
cat 1-2	<.0001	<.0001	0.0001	0.0363
cat 1-3	<.0001	<.0001	0.0010	0.0008
cat 1-4	<.0001	<.0001	<.0001	0.0262
cat 1-5	0.0021	0.0302	0.0194	0.1606
cat 1-6	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
cat 2-3	0.9699	0.5205	0.5534	0.1623
cat 2-4	0.0008	0.2588	0.0376	0.6594
cat 2-5	0.2341	0.9744	0.4643	0.5217
cat 2-6	<.0001	0.0005	<.0001	0.0015
cat 3-4	0.0197	0.1503	0.0348	0.3360
cat 3-5	0.2031	0.7306	0.3018	0.9675
cat 3-6	<.0001	0.0004	<.0001	0.0449
cat 4-5	0.9968	0.7128	0.9829	0.6369
cat 4-6	0.0008	0.0058	<.0001	0.0051
cat 5-6	0.0559	0.0571	0.0178	0.2583

Annexe 19 : Tableau de significativité des différences entre les catégories de la Figure 20



Annexe 20 : Comptages cellulaires et bactériologiques dans des laits de brebis issues d'une sélection divergente après inoculation de *S. aureus* (177)

Mathilde LIARD

Toulouse, 2017

**ANALYSES BACTÉRIOLOGIQUES ET CELLULAIRES DES ÉCHANTILLONS DE LAIT
CHEZ DES CHÈVRES APRÈS SÉLECTION DIVERGENTE SUR LA RÉSISTANCE AUX
MAMMITES**

**BACTERIOLOGICAL AND CELLULAR ANALYSES OF GOAT MILK AFTER
DIVERGENT SELECTION FOR RESISTANCE TO MASTITIS**

RESUME/ ABSTRACT

La concentration des cellules somatiques (CCS) est un critère très utilisé pour évaluer le statut infectieux de la mamelle chez la chèvre. Grâce à l'analyse en cytométrie en flux, celle-ci a été décomposée en concentrations de neutrophiles (vivants et morts), lymphocytes, macrophages dans le but d'étudier la réponse inflammatoire locale chez deux lignées de chèvres génétiquement divergentes sur le critère de la CCS. L'objectif de cette étude était de décrire l'évolution au cours de la lactation de la CCS en fonction du statut bactériologique. Les infections mammaires chez les chèvres de la lignée résistante sont moins fréquentes et avec des titres bactériens plus faibles d'après les données acquises par les méthodes conventionnelle et moléculaire. De plus, leurs réponses inflammatoire et immunitaire locales semblent plus efficaces lors d'infection.

Somatic cell count (SCC) has been regularly used to evaluate the infectious status of the mammary gland in goats. In this study, SCC was broken down, thanks to flow cytometry, into numerations of lymphocytes, macrophages and neutrophils (living and dead cells) in order to study the local immune response in two goat lines that are genetically divergent based on the SCC criteria. The goal of this study was to describe, SCC changes during the lactation in relation with the bacteriological results. Mammary infections in resistant goats are less common and with a lower titre, according to conventional and molecular bacteriology. In addition, their local inflammatory and immune responses seem to be more efficient in case of a bacterial infection.

MOTS CLES/ KEYWORDS

- caprin, chèvre / *goat*
- génétique / *genetic*
- cytométrie / *cytometry*
- bactériologie / *bacteriology*
- mammite / *mastitis*