




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's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 25631

To cite this version:

Duheron, Charlotte . *Effet du gène SOCS-2 sur la réponse inflammatoire systémique lors de mammite à Staphylococcus aureus*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2019, 136 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

EFFET DU GENE SOCS-2 SUR LA REPONSE INFLAMMATOIRE SYSTEMIQUE LORS DE MAMMITE A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

Charlotte DUHERON

Née, le 12 septembre 1994 à LA FERTE MACE (61)

Directeur de thèse : Mr Gilles FOUCRAS

JURY

PRESIDENT :

Mr Eric OSWALD

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mr Gilles FOUCRAS

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mr Dominique BERGONIER

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur par intérim : Frédéric Bousquet

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAITRES DE CONFÉRENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

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 **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie - Analgésie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- 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. **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*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
- Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophtalmologie*
- M. **TOUITOU Florent**, *Alimentation animale*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
- M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*

Remerciements

A notre Président de thèse,

Monsieur Eric OSWALD

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Bactériologie

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

Hommage respectueux.

A notre jury de thèse,

A Monsieur le Professeur Gilles FOUCRAS

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des ruminants

Qui nous a fait l'honneur de nous confier ce projet.

Pour sa disponibilité et ses conseils tout au long de son élaboration,

Veillez accepter l'expression de ma reconnaissance et mes remerciements les plus sincères.

A 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 notre jury de thèse,

Qu'il trouve, ici, l'expression de mes sincères remerciements.

A Madame Rachel RUPP et son équipe

Pour nous avoir permis d'intégrer ce projet de recherche et pour leur aide,

Sincère reconnaissance.

Table des matières

Liste des enseignants	3
Remerciements	5
Table des illustrations	11
Table des annexes	13
Abréviations.....	15
Introduction.....	17
Première partie : Étude bibliographique.....	19
I. Infections et inflammations mammaires de la brebis.....	21
I.1. Importance des mammites en élevage ovin laitier.....	21
I.1.1. Description clinique.....	21
I.1.2. Sévérité des mammites en élevage ovin laitier	23
I.1.3. Conséquences pour la production	24
I.1.3.a. Taux de réforme et mortalité	24
I.1.3.b. Production laitière.....	24
I.1.3.c. Prix du lait.....	25
I.1.3.d. Composition du lait.....	25
I.1.3.e. Croissance des agneaux	26
I.1.3.f. Coût de la maîtrise	26
I.2. Méthodes de dépistage des mammites en élevage.....	26
I.2.1. Dépistage des cas cliniques.....	26
I.2.2. Diagnostic bactériologique	28
I.2.2.a. Culture bactérienne	28
I.2.2.b. PCR.....	29
I.2.3. Critères indirects de l'inflammation	29
I.2.3.a. Les cellules somatiques du lait	29
I.2.3.b. Conductivité du lait.....	31

II. Etiopathogénie.....	32
II.1. Facteurs infectieux	32
II.1.1. Importance des différents germes	32
II.1.1.a. Prévalence générale	32
II.1.1.b. Cas des mammites cliniques.....	33
II.1.1.c. Cas des mammites subcliniques	34
II.1.2. Les bactéries	34
II.1.2.a. Principales espèces bactériennes à l'origine de mammites.....	34
II.1.2.b. Réservoirs et modes de transmission.....	38
II.1.3. Les champignons et les levures	39
II.1.4. Les virus.....	40
II.2. Mécanismes protecteurs et réponse immunitaire	40
II.2.1. Défenses passives	41
II.2.2. Mécanismes immunitaires	42
II.2.2.a. L'immunité innée.....	42
II.2.2.b. L'immunité adaptative.....	45
II.3. Facteurs environnementaux	47
II.4. Facteurs liés à l'hôte	49
III. Méthodes de lutte et moyens de prévention	51
III.1. Méthodes de lutte conventionnelle en élevage	51
III.1.1. Traitements curatifs	51
III.1.2. Gestion d'élevage et hygiène de la traite	54
III.1.3. Vaccination	56
III.2. Sélection génétique pour une résistance accrue.....	57
III.2.1. Principes généraux de l'amélioration génétique en élevage	57
III.2.1.a. Notions préalables et sélection classique (La révolution génomique animale 2011)	58
III.2.1.b. Les programmes de sélection.....	60
III.2.1.c. Utilisation de la génomique pour la sélection.....	61
III.2.2. Objectifs de sélection chez la brebis laitière.....	67
III.2.3. Application à la sélection sur la résistance aux mammites	73

Partie 2 : Etude expérimentale	77
I. Matériel et méthodes	79
I.1. Animaux.....	79
I.1.1. Ressources disponibles	79
I.1.2. Critères d'inclusion.....	80
I.2. Hébergement et alimentation	80
I.3. Conduite.....	81
I.4. Protocole expérimental	81
I.4.1. Calendrier	81
I.4.2. Inoculation	82
I.5. Examens cliniques	82
I.6. Traitement des échantillons	83
I.6.1. Nature des échantillons prélevés et conditionnement	83
I.6.2. Analyses.....	84
I.6.3. Autopsies	86
I.7. Analyses statistiques	86
II. Résultats	87
II.1. Caractérisation des scores généraux	87
II.1.1. Evolution générale au cours de l'infection.....	87
II.1.2. Evolution selon le génotype <i>Socs2</i>	90
II.2. Caractérisation des profils cellulaires et cytokiniques sanguins.....	91
II.2.1. Evolution des profils cellulaires	91
II.2.2. Evolution des profils cytokiniques.....	93
II.3. Influence de <i>Socs2</i> sur les autres caractères	95
II.3.1. Evolution de la production laitière.....	95
II.3.2. Effet du génotype <i>Socs2</i> sur le poids et la croissance.....	98
III. Discussion	99
III.1. Scores cliniques	100

III.2. Dosages sanguins	101
III.2.1. Profils cellulaires	101
III.2.2. Profils cytokiniques	104
III.2.3. SOCS-2 et mécanismes immunitaires.....	105
III.3. Effet pléiotrope de Socs2	108
Conclusion	109
Bibliographie	111
Annexes	119

Table des illustrations

Table des figures :

Figure 1 : Signes locaux observables lors de l'examen clinique (CREMOUX et al. 2018)	27
Figure 2 : Relation entre la moyenne géométrique annuelle des CCS du tank et la prévalence estimée des brebis considérées comme infectées selon leur CCS individuels (Berthelot et al. 2006)	31
Figure 3 : Prévalence des bactéries impliquées lors de mammites subcliniques (Bergonier et al. 2003)	34
Figure 4 : Sections longitudinales de trayon montrant la surface interne de kératine et le sphincter (Nickerson 2011)	41
Figure 5 : Facteurs de risque morphologiques associés à des CCS significativement plus élevées (CREMOUX et al. 2018)	49
Figure 6 : Effet du milieu sur le niveau d'héritabilité (La révolution génomique animale 2011)	60
Figure 7 : Exemple de marqueur microsatellite (La révolution génomique animale 2011)	62
Figure 8 : Exemple de marqueur SNP (La révolution génomique animale 2011)	62
Figure 9 : Exemple de recombinaison au cours de la méiose (La révolution génomique animale 2011)	64
Figure 10 : Mise en évidence de la relation QTL-phénotype via les marqueurs (La révolution génomique animale 2011)	65
Figure 11 : Schéma de sélection classique en ovine laitier (Lagriffoul et al. 2016)	68
Figure 12 : Evolution de la production nationale de lait de brebis en France par bassin (Lagriffoul et al. 2016)	69
Figure 13 : Evolution du taux de matière sèche utile du lait collecté dans le Rayon de Roquefort (Lagriffoul et al. 2016)	69
Figure 14 : Apparition successive des critères de sélection dans chaque bassin et leurs proportions actuelles en Lacaune et ROLP (Astruc, Buisson 2018)	70
Figure 15 : Différentes étapes de sélection dans les schémas de sélection classique (Astruc et al. 2016)	71
Figure 16 : Évolution de la consanguinité moyenne des béliers du noyau de sélection de 1970 à 2013 dans les 5 races ovines laitières (Buisson et al. 2018)	72
Figure 17 : Evolution des scores des différents critères de l'examen clinique général	88
Figure 19 : Evolution du score général au cours de l'infection	89
Figure 18 : Superposition des scores relatifs aux critères des muqueuses, de fréquence cardiaque, température, appétit et abattement	89
Figure 20 : Evolution du score général en fonction du génotype C/C ou T/T (Stat : 2way ANOVA : NS)	90
Figure 21 : Evolution des leucocytes sanguins au cours de l'infection pour chaque génotype	91
Figure 22 : Profils cytokiniques montrant des différences significatives entre les individus de génotype C/C et T/T	94
Figure 23 : Evolution de la concentration en IL8 par rapport à la concentration basale pour chaque génotype	95
Figure 24 : Evolution de la production laitière avant inoculation selon le génotype Socs2	95
Figure 25 : Evolution de la production par hémimamelle en fonction du statut infectieux	96

Figure 26 : Evolution de la production selon le génotype Socs2 pour l'hémimamelle inoculée et non inoculée _	97
Figure 27 : Poids des brebis et de certains organes selon le génotype Socs2 _____	98
Figure 28 : Taille des os longs selon le génotype Socs2 _____	99

Table des tableaux :

Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de mammites cliniques (Ramond 2015) _____	22
Tableau 2 : Principales différences significatives observables entre lignées SCS+ et SCS- _____	74
Tableau 3 : Types cellulaires dont les profils montrent des valeurs significativement plus élevées chez les individus de génotype C/C et T/T _____	92

Table des annexes

Annexe 1 : Fiche d'examen clinique général.....	119
Annexe 2 : Fiche d'examen de la mamelle.....	120
Annexe 3 : détail du calcul des scores généraux.....	121
Annexe 4 : détail du calcul des scores mammaires.....	122
Annexe 5 : Profils cellulaires sanguins des grandes lignées de leucocytes (Lineage staining) pour chaque génotype C/C ou T/T.....	123
Annexe 6 : Profils cellulaires sanguins des sous-classes de lymphocytes T (T cells staining) pour chaque génotype C/C ou T/T.....	123
Annexe 7 : Profils cellulaires des lignées myéloïde de leucocytes (Myeloid staining) pour chaque génotype C/C ou T/T.....	123
Annexe 8 : Profils cytokiniques plasmatiques pour chaque génotype C/C et T/T.....	123
Annexe 9 : Evolution de la production laitière selon le statut infection de l'hémimamelle.....	123
Annexe 10 : Evolution de la production de lait de l'hémimamelle non inoculée selon le génotype Socs2.....	123
Annexe 11 : Evolution de la production de lait de l'hémimamelle non inoculée selon le génotype Socs2.....	123

Abréviations

AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
BB : Basco-Béarnaise
CCS : Concentration de Cellules Somatiques
CCSi : Concentration de Cellules Somatiques individuelle
Cel. : Cellules
CLO : Contrôle Laitier Officiel
CLS : Contrôle Laitier Simplifié
cM : Centimorgan
ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
GH : Growth Hormone
GMQ : Gain Moyen Quotidien
 h^2 : héritabilité
hpi : heure post-inoculation
IA : Insémination Artificielle
ILC : Innate Lymphoid Cells
IMI : Infection Intramammaire
ISOL : Index de Synthèse Ovin Lait
KASP : Kompetitive Allele Specific PCR
LL : Lacaune lait
Mb : Million de bases
MTN : Manech Tête Noire
MNR : Manech Tête Rousse
NK : Natural Killer
PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Pattern
PNAG : Poly-N-Acetyl- β -1,6-Glucosamine
GNN : Granulocyte Neutrophile
PRR : Pattern-Recognition Receptor
QTL : Quantitative Trait Loci
ROLP : Races Ovines des Pyrénées-Atlantiques
SAM : Sélection Assistée par Marqueurs

SCN : Staphylocoque Coagulase Négatif

SCP : Staphylocoque Coagulase Positif

SNP : Single Nucléotide Polymorphism

SOCS : Suppressor Of Cytokine Signalling

TB : Taux Butyreux

TCR : T Cell Receptor

TP : Taux Protéique

UFC : Unité Formant Colonie

UMR IHAP : Unité Mixte de Recherche Interaction Hôtes-Agents Pathogènes

UMT GGPR : Unité Mixte Technologique Gestion Génétique et Génomique des Petits Ruminants

Introduction

Les infections mammaires représentent une dominante pathologique en élevage ovin laitier, avec des conséquences économiques pouvant être considérables. La lutte contre ces affections est aujourd'hui prioritaire à l'augmentation de la production laitière en race Lacaune. La sélection génétique s'intéresse aujourd'hui à élever des animaux plus résistants. Les travaux de recherche se sont d'abord portés sur la sélection d'animaux avec des CCS plus faibles, via la création de deux lignées de sensibilité significativement différentes face aux mammites. Les progrès technologiques ont plus récemment permis de mieux caractériser les bases génétiques de la résistance aux mammites, notamment par l'identification d'un QTL majeur relatif à ce caractère. Les mécanismes sous-jacents impliqués étant encore méconnus, cette étude a pour objectif d'identifier des différences immunitaires et inflammatoires systémiques entre deux groupes de brebis de génotype *Socs2* face à une infection mammaire à *Staphylococcus aureus*.

Nous verrons dans une première partie une étude bibliographique présentant les généralités sur les mammites des ovins, c'est-à-dire leur importance en élevage laitier, leur étiologie, le diagnostic et les méthodes de luttés. Une partie s'intéressera particulièrement à l'introduction du caractère de résistance aux mammites dans les critères de sélection, avec la découverte de la mutation du gène *Socs2*, qui fait l'objet de cette étude.

La seconde partie traitera de l'épreuve expérimentale ; nous commencerons par comparer l'expression clinique d'une mammite expérimentale à *Staphylococcus aureus* entre les deux groupes génétiques selon le variant de SOCS-2, puis nous comparerons leurs numérations leucocytaires et la concentration de plusieurs cytokines sanguines.

Première partie : Étude bibliographique

I. Infections et inflammations mammaires de la brebis

I.1. Importance des mammites en élevage ovin laitier

Une mammite est une réaction inflammatoire de la glande mammaire, due à la colonisation, le plus souvent ascendante, d'un germe d'origine bactérienne dans 98% des cas, et d'origine virale dans de plus rares cas.

I.1.1. Description clinique

Chez la brebis, 80 à 87% des mammites sont unilatérales, c'est-à-dire qu'elles ne concernent qu'une seule des deux hémi-mamelles (Kirk, Glenn, Maas 1996). D'un point de vue clinique, les mammites s'expriment avec des degrés d'intensité variables. On classe donc les mammites en deux grandes catégories selon la présence ou non de symptômes généraux, locaux ou fonctionnels : les mammites cliniques et les mammites subcliniques.

Les mammites cliniques sont caractérisées par la présence de signes observables cliniquement. Elles sont classées en mammites suraiguës, aiguës et chroniques (ou subaiguës) selon la vitesse d'apparition et la durée d'évolution de ces signes ; elles peuvent être de sévérité variable.

La présence de signes fonctionnels est commune à toutes les mammites cliniques ; il s'agit d'une modification de la sécrétion lactée, qu'elle soit quantitative ou qualitative. Une diminution de la quantité de lait produit, qui peut aller jusqu'à l'agalactie (arrêt complet de la sécrétion de lait) est souvent présente, associée ou non à la présence de grumeaux dans le lait, une modification de sa couleur (plus translucide ou avec du sang, qualifiée alors d'hémolactation), de son aspect... Ces grumeaux sont constitués d'agglomérats de débris de tissus, de leucocytes et de protéines comme conséquences de l'inflammation, et sont un signe pathognomonique de la présence d'une mammite clinique, bien qu'ils ne soient pas systématiquement présents.

Les signes locaux sont les signes classiques de l'inflammation, que l'on peut observer au niveau d'une ou des deux hémi-mamelles : rougeur, chaleur, œdème et douleur. Ils ne sont pas toujours tous présents en même temps. Pour les mammites chroniques, des modifications morphologiques de la mamelle dues à la chronicité, avec une évolution de plusieurs semaines, sont visibles ; on observe notamment des indurations fibreuses nodulaires ou focales et une

atrophie plus ou moins sévère entraînant une dysymétrie, qualifiée de déséquilibre de la mamelle. Dans le cas particulier des mammites gangreneuses, ces signes d'inflammation sont rapidement suivis par une extension de la zone atteinte qui devient violacée et froide consécutivement à la gangrène qui s'étend progressivement, et l'apparition d'une délimitation nette appelée sillon disjoncteur.

Enfin, des symptômes généraux adviennent lors de mammites suraiguës ou aiguës, avec principalement une hyperthermie plus ou moins marquée et différentes conséquences possibles comme une anorexie, un arrêt de la rumination et de la motricité ruminale, de l'abattement, une déshydratation, ...

Les caractéristiques des différents types de mammites cliniques sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de mammites cliniques (Ramond 2015)

Types de symptômes	Mammite suraiguë	Mammite aiguë	Mammite chronique (ou subaiguë)
Symptômes généraux	Très présents Hyperthermie Etat général très altéré	Présents Hyperthermie +/- Etat général peut être altéré	Absent
Symptômes locaux	Très présents Très forte inflammation	Présents Inflammation modérée	Parfois, peu visibles Très faible inflammation
Symptômes fonctionnels	Très présents Forte diminution de la sécrétion lactée Grumeaux	Présents Qualité du lait très modifiée, grumeaux	Parfois présents En général lait peu modifié, parfois présence de grumeaux
Apparition et évolution	Quelques heures	24h à quelques jours	Semaines

Les mammites subcliniques ne sont pas cliniquement détectables car elles ne provoquent pas de symptômes ; c'est pourquoi elles sont difficiles à détecter et de ce fait, elles sont sous-diagnostiquées en élevage. *A minima*, elles sont associées à la présence de germes dans le lait, à une augmentation de la concentration cellulaire (notamment celle des GNN), à des variations de la composition ionique, ainsi que des modifications physico-chimiques de la composition du

lait, avec une diminution de la synthèse de triglycérides et de protéines du lait remplacées par des protéines inflammatoires.

I.1.2. Sévérité des mammites en élevage ovin laitier

Les infections intra-mammaires, et les mammites qui en résultent, constituent la deuxième cause de réforme en élevage ovin laitier après la production laitière jugée insuffisante. Il s'agit donc de la première cause de réforme pour raison sanitaire (Bergonier et al. 2003). Ces mammites peuvent advenir à n'importe quel stade de la lactation, et ne pas être éliminées durant la période sèche si bien qu'elles persistent d'une lactation à la suivante (Bergonier et al. 1997). Il existe cependant deux périodes critiques durant lesquelles le risque d'apparition d'une mammite est plus élevé :

- la semaine qui suit l'agnelage, à la suite de profondes modifications physiologiques
- le sevrage des agneaux et le début de la traite dite exclusive.

En moyenne, la prévalence des mammites cliniques ne dépasse pas le seuil de 5% par an, même si on peut observer dans de rares cas des épizooties pouvant affecter 30 à 50 % du troupeau. Elle est plus élevée dans les troupeaux conduits en bâtiment (Cooper et al. 2016). Ces mammites cliniques apparaissent majoritairement lors de la première semaine suivant l'agnelage, soit à cause d'une infection pré-existante qui s'exprime avec le début de la lactation, ou à la suite d'une nouvelle infection du fait de la possibilité de nouvelles contaminations à cause de l'ouverture du sphincter à l'extrémité du canal du trayon et la contamination par des germes de l'environnement ou issus de la bouche des agneaux.

Leur persistance est variable mais généralement élevée et supérieure à 60% dans la majorité des cas (Bergonier et al. 1997). Cette persistance est due notamment au fait que ces infections sont souvent mal dépistées, et qu'elles ne sont pas traitées précocement alors qu'elles sont majoritairement provoquées par des Staphylocoques, bactéries fréquemment associées au développement d'infections chroniques ; on a donc très souvent un passage à la forme chronique d'une infection subclinique.

Les mammites cliniques ne sont pourtant que la partie émergée de l'iceberg ; en effet, lors de l'apparition de mammites cliniques dans un élevage, il faut soupçonner une plus grande proportion encore de mammites subcliniques, qui ne sont pas détectables sans le recours à des moyens techniques complémentaires. D'après certains auteurs, il y aurait 15 à 40 fois plus de

mammites subcliniques que de mammites cliniques observées (Khan 2006). Leur prévalence moyenne est de 20 à 30 % dans les élevages ovins, et leur persistance est variable selon le pathogène impliqué ; là aussi, elle est souvent élevée puisque ces mammites sont encore moins bien détectées que les mammites cliniques : d'après une étude menée par Bergonier et al (2003), la moitié des glandes infectées seraient excrétrices de germes durant au moins 3 à 4 mois. Il arrive fréquemment qu'une brebis ait 2 ou 3 infections mammaires successives. Le taux de guérison spontanée durant la période sèche oscille entre 35 et 67%, ce qui explique l'apparition de mammites cliniques en peripartum, comme indiqué plus haut, à une période où l'immunité est moins efficace.

I.1.3. Conséquences pour la production

Les mammites représentent un problème majeur en filière laitière. Outre l'aspect sanitaire avec le risque de toxi-infection alimentaire en lien avec la consommation de produits contaminés dans les filières utilisant du lait cru, les conséquences économiques sont majeures à cause des pertes directes mais aussi indirectes liées à la diminution de la quantité et de la qualité du lait, et aux coûts engendrés par les mesures nécessaires à leur maîtrise.

I.1.3.a. *Taux de réforme et mortalité*

Une mammite clinique suraiguë, voire aiguë, qui peut se compliquer d'une bactériémie ou d'un choc endotoxinique peut causer la mort de l'animal. Ces types de mammites, survenant principalement en début de lactation, représentent, outre la perte de l'animal, une perte de la production à venir pour l'éleveur. Lorsque les brebis survivent à cet épisode, elles sont le plus souvent réformées précocement, même si elles ne le sont souvent qu'à la fin de la lactation. Les réformes liées à une mammite clinique représentent 5 à 10% des réformes totales (Brugère-Picoux 2016).

I.1.3.b. *Production laitière*

La baisse de la production laitière est la principale cause de perte économique. En effet, si les mammites cliniques l'affectent significativement, les mammites subcliniques sont aussi responsables d'une diminution de la production laitière, certes moins marquée, mais qui affecte un plus grand nombre de brebis, comme déjà indiqué précédemment. Alors que le coût dû aux cas cliniques est assez facile à estimer par l'éleveur, celui lié aux cas subcliniques est beaucoup plus difficile à percevoir et à apprécier alors qu'il est pourtant majeur. La diminution moyenne est de 15% environ pour une mammite subclinique unilatérale, et d'autant plus élevée que

l'infection est proche de l'agnelage (Olives et al. 2013). Il existe une réponse compensatoire de l'hémimamelle controlatérale saine qui va produire plus de lait, ce qui corrige partiellement la perte de production de l'hémimamelle infectée. C'est pourquoi la perte globale est beaucoup plus grande (près de 58%) lorsque la mammite est bilatérale (Ramond 2015).

A cela s'ajoute les modifications du parenchyme mammaire engendrées par le processus inflammatoire (abcès enkysté, induration fibreuse et atrophie) qui restera improductif à l'issue de la cicatrisation et de l'élimination des germes (lorsqu'elle se produit) au cours de la lactation suivante.

1.1.3.c. *Prix du lait*

Contrairement à l'élevage bovin laitier, il n'y a pas d'interdiction de collecte au-delà d'une valeur seuil des CCS (Concentration de Cellules Somatiques). Cependant, il existe tout de même des pénalités sur le prix du lait au-delà d'une concentration de 800 000 cellules/mL (cel./mL) du lait livré.

1.1.3.d. *Composition du lait*

Cela concerne avant tout le lait des mammites subcliniques, puisque celui des mammites cliniques est normalement écarté de la collecte. Celui-ci va perdre ses aptitudes à la transformation, et notamment sa fromageabilité. En effet, l'inflammation locale associée à la mammite va tout d'abord augmenter la perméabilité des vaisseaux sanguins, laissant passer dans le lait de nombreux composés sanguins comme l'albumine, des immunoglobulines, la transferrine... auxquels s'ajoute une forte migration de neutrophiles. Parallèlement, le processus de synthèse des composants naturels du lait est altéré, avec entre autres, une baisse de la concentration en protéines solubles (notamment des caséines), des acides gras et du lactose (Khan 2006), en plus de la protéolyse et de la lipolyse. La composition minérale est également modifiée avec des concentrations plus élevées du chlore et du sodium d'origine sanguine, et plus basse du calcium, du phosphore et du potassium, qui conduisent à des valeurs du pH du lait plus élevées. La faible teneur en calcium s'explique d'une part parce qu'il est lié aux caséines dont la proportion est diminuée, et parce que son absorption depuis le sang est altérée. Les caséines et le calcium participant à la formation du caillé, le temps de coagulation du lait est par conséquent augmenté et la vitesse de raffermissement est diminuée. La baisse de la concentration du lactose détériore de plus les propriétés d'acidification.

1.1.3.e. *Croissance des agneaux*

Les agneaux nés de brebis avec une mammitite ont une croissance et un gain moyen quotidien (GMQ) plus faibles que ceux nés de brebis saines. Cela s'explique par le refus des mères de laisser téter les agneaux à cause de la douleur, et par le fait que la croissance des agneaux est bien corrélée à la production laitière (Torres-Hernandez, Hohenboken 1980), qui est diminuée en cas de mammitite. Or, dans les ateliers ovins de production laitière, l'élevage des agneaux vient grever la quantité de lait livrée ; il faut donc qu'ils atteignent au plus vite le poids minimal nécessaire pour la vente et permettre leur sevrage.

1.1.3.f. *Coût de la maîtrise*

Les coûts générés pour la maîtrise des infections intramammaires (IMI) comprennent le coût des traitements en lactation pour les mammites cliniques, bien qu'ils soient rares à très rares, et celui du traitement des mammites subcliniques au tarissement (afin qu'elles ne persistent pas d'une lactation à l'autre) ; ceux-ci peuvent rapidement atteindre un montant égal au prix de la brebis. De plus, le traitement en lactation nécessite de respecter un temps d'attente, variable en fonction de la molécule utilisée, pendant lequel le lait ne pourra pas être livré. Lorsque la prévalence est élevée, il faut rajouter à ces frais de maîtrise d'autres sources de dépenses, comme celles liées aux analyses bactériologiques permettant d'identifier le germe en cause dans l'élevage, le contrôle de la machine à traire sur un rythme annuel et les éventuelles réparations, ainsi que les produits d'hygiène pour la désinfection des trayons.

I.2. Méthodes de dépistage des mammites en élevage

I.2.1. Dépistage des cas cliniques

Les mammites cliniques peuvent être assez aisément diagnostiquées par les éleveurs. Il s'agit de rechercher les signes cliniques pouvant advenir comme décrit plus haut au moment de la traite : les signes généraux, locaux et fonctionnels

Les signes généraux d'un syndrome fébrile sont rapidement mis en évidence par les éleveurs qui vont noter un changement de comportement. Il peut être léger ou aller jusqu'à l'anorexie, l'isolement de l'animal ou l'incapacité à se relever. La prise de la température rectale peut facilement mettre en évidence une hyperthermie. Cependant ces signes d'appel sont

présents dans de nombreuses autres affections, et doivent inciter à rechercher les autres signes d'une mammite clinique pour la diagnostiquer avec certitude.

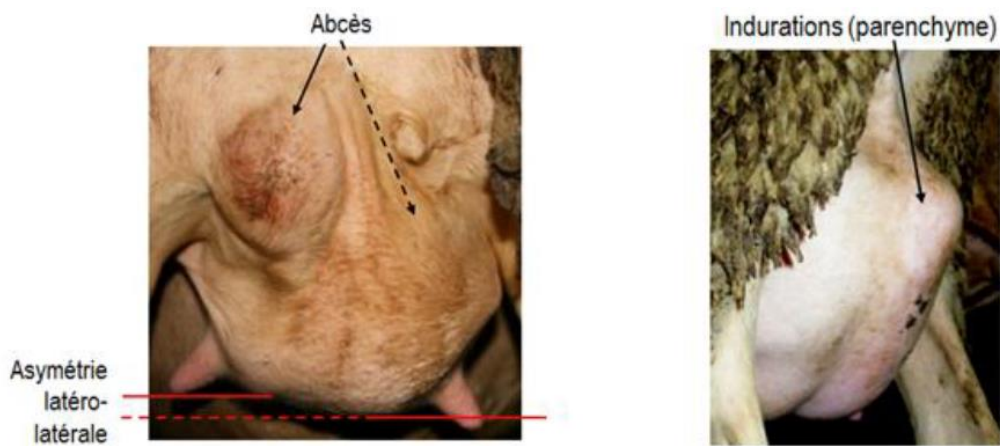


Figure 1 : Signes locaux observables lors de l'examen clinique (CREMOUX et al. 2018)

Les signes locaux, cités précédemment, sont détectés par examen visuel et palpation, à l'occasion de la traite ou à la suite de l'observation de signes généraux. La palpation doit permettre de distinguer entre autres une induration du parenchyme mammaire, une asymétrie lorsque la mammite est unilatérale (Bergonier et al. 1997) et doit inclure la palpation des nœuds lymphatiques rétromammaires dont la taille est augmentée lors d'infection. Elle sera plus facile à réaliser après la traite. Elle devrait être systématique à certaines périodes comme à la mise bas, au sevrage ou au tarissement.

Les signes fonctionnels peuvent être recherchés en éjectant les premiers jets dans un bol à fond noir pour visualiser les grumeaux et l'aspect éventuellement modifié du lait. Cette pratique courante en élevage bovin est techniquement difficile à réaliser en élevage ovin en raison du grand nombre d'animaux manipulés par un petit nombre d'opérateurs, et de la vitesse d'exécution de la traite ; cependant, elle doit être réalisée systématiquement en cas de doute ou d'observation de signes locaux. La baisse de la quantité de lait produit peut aussi être évaluée par les éleveurs ayant accès au suivi de la production individuelle des animaux.

Ces éléments sont faciles à détecter et bien connus des éleveurs ; cependant ils ne permettent pas de connaître le germe impliqué, ni de détecter les mammites subcliniques.

I.2.2. Diagnostic bactériologique

Il s'agit de mettre en évidence de façon directe la présence de bactéries dans le lait. Cela est nécessaire pour réaliser un diagnostic étiologique précis sur la nature du germe responsable de la mammites, et pour adapter au mieux le traitement à utiliser.

I.2.2.a. Culture bactérienne

Il s'agit de la méthode de référence couramment utilisée, qui consiste à rechercher la croissance de bactéries à partir d'un échantillon de lait, prélevé de manière aseptique, sur ou dans différents milieux de culture.

Pour cela, une gélose agar estensemencée avec un volume de 10 à 100 µL de lait. Un milieu non sélectif, qui permettra d'identifier les éventuelles contaminations du prélèvement peut être utilisé. En effet, l'agent causal est identifié si un seul (ou quelques) type(s) de colonies est(sont) visible(s) sur la gélose, avec au minimum trois colonies (Fragkou, Boscós, Fthenakis 2013). L'enrichissement préalable permet de réduire la proportion d'isolements faussement négatifs. Il est possible d'utiliser des milieux plus ou moins sélectifs : Gram +, Gram –, milieux anaérobies ou sélectifs de certaines familles (Staphylocoques, Streptocoques, Entérobactéries...). Les géloses sont placées dans un incubateur pendant 48 à 72h avant la lecture des résultats.

L'identification du ou des germes repose sur la morphologie des colonies, la coloration Gram si l'on n'a pas utilisé de milieu sélectif, et des tests biochimiques simples qui révèlent l'activité enzymatique des bactéries en présence de certains réactifs. Il existe des micro-galeries d'identification biochimique, qui sont un ensemble de tests biochimiques couramment utilisés pour l'identification des micro-organismes, représentés en version miniaturisée sur une même plaquette pour une réalisation plus simple. Cependant, ces galeries nécessitent une durée d'incubation de 24 à 48h. Dorénavant, la spectrométrie de masse tend à supplanter les méthodes traditionnelles ; elle identifie le profil protéique des bactéries isolées en culture, et celui-ci est très spécifique de chaque genre ou espèce bactérienne.

La culture bactérienne reste la méthode de référence pour identifier les agents pathogènes ; elle offre en outre la possibilité de réaliser un antibiogramme. Son plus grand inconvénient est la durée nécessaire à l'obtention des résultats : il faut compter au minimum 3 jours sans la réalisation d'un antibiogramme. Cette contrainte technique ne permet pas de mettre

en place un traitement ciblé assez précocement pour traiter une mammite clinique. On peut facilement réaliser ces cultures au cabinet vétérinaire ; des kits commerciaux prévus à cet effet sont même disponibles, mais la sensibilité et la spécificité sont moindres, et l'identification d'espèce reste grossière.

1.2.2.b. *PCR*

La technique PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne) permet de rechercher la présence du génome bactérien dans l'échantillon après extraction de l'ADN. Cette technique a le gros avantage d'être beaucoup plus rapide que la culture (quelques heures) et plus sensible et précise, mais son coût est non négligeable (environ 30 euros).

Il existe aujourd'hui des PCR multiplexes, qui permettent de mettre en évidence plusieurs agents dans la même réaction. Cependant, cette technique est fermée, dans le sens où tous les germes pouvant provoquer une mammite ne sont pas identifiés par la PCR ; un résultat négatif ne permet pas d'exclure la présence d'un germe.

1.2.3. Critères indirects de l'inflammation

1.2.3.a. *Les cellules somatiques du lait*

Comme chez la vache, les CCS dans le lait de la brebis sont un bon marqueur de l'inflammation mammaire et sont aujourd'hui largement utilisées pour déterminer le statut sanitaire des mamelles.

Le lait issu d'une mamelle saine montre en moyenne des concentrations cellulaires inférieures à 100×10^3 cel./mL (Paape et al. 2001; Bergonier et al. 2003). Parmi elles, les cellules mononucléées sont majoritaires, avec des macrophages entre 45 et 85%, des neutrophiles entre 2 et 35%, des lymphocytes entre 10 et 20% et de 2 à 3 % de cellules épithéliales.

Lors d'infection, les GNN migrent en grand nombre par diapédèse du sang vers le parenchyme mammaire en réponse à l'infection locale ; une partie d'entre eux se retrouvent dans le lait. Les CCS augmentent en conséquence, parfois très fortement, pouvant atteindre dans les cas extrêmes 50×10^6 cel./mL pour les mammites cliniques, avec un pourcentage de neutrophiles supérieur à 90%. Son importance et son évolution sont variables selon la virulence de l'agent pathogène et le statut immunitaire de l'animal (Bonfont 2011).

L'augmentation des CCS est plus marquée en réponse à certains facteurs, le plus influent étant le stade de lactation ; le colostrum contient également beaucoup de cellules. Les CCS sont donc élevées après la mise bas, puis baissent rapidement quand la production de lait apparaît, et la diminution se poursuit au fur et à mesure que la production laitière augmente jusqu'au pic (Paape et al. 2001), la valeur des CCS augmente à nouveau vers la fin de la lactation.

Les valeurs de CCS augmentent avec le rang de lactation, et pour les brebis ayant élevé au moins deux agneaux (Deverrière 2007). La CCS varie aussi en fonction de la fraction analysée et elle est élevée juste après la traite (augmentation de 70% dans l'heure qui suit la traite, (Bergonier, Berthelot 2003)), puis elle diminue avec l'accumulation de lait : la valeur est donc plus élevée pour la traite du soir que pour celle du matin. Malgré ces facteurs de variation, le principal facteur de variation de la CCS reste la survenue d'une infection intramammaire (Moles 2002), si bien que la CCS est un très bon marqueur pour le diagnostic des mammites, notamment les mammites subcliniques.

Les CCS sont déterminées dans le cadre du contrôle laitier officiel, à partir d'un échantillon de lait issu des deux héli-mamelles. La méthode la plus utilisée pour cette mesure est un compteur automatique fluoro-opto-électronique, qui est une technique de dénombrement par mesure de la fluorescence de l'ADN contenu dans les cellules somatiques du lait.

Il existe d'autres méthodes indirectes facilement réalisables en élevage, comme le California Mastitis Test (CMT). Il s'agit là aussi d'une réaction avec l'ADN des cellules somatiques, qui est libéré après la lyse des cellules et produit un gel à partir d'une valeur seuil de 400×10^3 cel./mL. La gélification sera d'autant plus marquée que la CCS est élevée.

Pour qualifier le statut sanitaire d'un animal ou d'une héli-mamelle, il est possible d'utiliser une valeur ponctuelle de la CCS, en utilisant une valeur seuil à partir de laquelle la glande est considérée « infectée ». Différentes études s'accordent pour dire qu'une mamelle peut être considérée comme saine si la CCS est inférieure à 200×10^3 cel./mL (Moles 2002). Cependant, la détermination de ce seuil est discutée, compte tenu des fluctuations fréquentes des valeurs de la CCS du fait de variations physiologiques et de la dynamique des infections (Bergonier, Berthelot 2003).

Pour une meilleure sensibilité de détection, il est préférable d'avoir plusieurs valeurs de CCS au cours de la lactation. On pourra à partir de ces mesures établir une règle de décision selon deux seuils définissant trois classes : « mamelle saine », « infectée » et « douteuse ».

Différentes études ont cherché à déterminer ces valeurs seuils et ont défini une règle de décision proche de celle de Berthelot et al (2006) :

- Mamelle saine : toutes les valeurs sont inférieures à 500 000 cel./mL
- Mamelle infectée : au moins 2 valeurs supérieures à 1 000 000 cel./mL
- Cas douteux : autres situations

La spécificité et la sensibilité de cette règle ont été estimées respectivement à 75% et 82%.

Il a également été mis en évidence que les CCS du tank étaient corrélés avec la prévalence des mammites dans l'élevage. Ainsi, pour une moyenne géométrique annuelle des CCS du tank de 650 000 cel./mL, on estime que la prévalence de mammites subcliniques est d'environ 15%. Une variation de 100 000 cel./mL correspond alors à une variation de la prévalence de 2 à 3%.

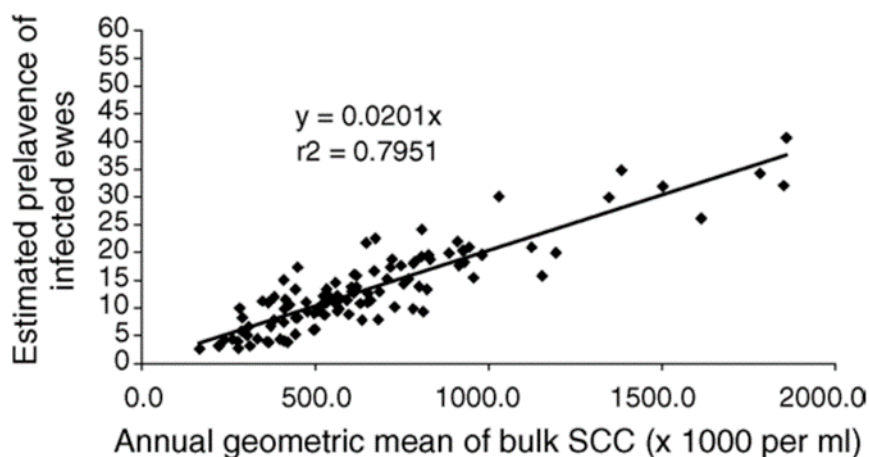


Figure 2: Relation entre la moyenne géométrique annuelle des CCS du tank et la prévalence estimée des brebis considérées comme infectées selon leur CCS individuels (Berthelot et al. 2006)

1.2.3.b. Conductivité du lait

La conductivité du lait est déterminée par le profil ionique, notamment la concentration des ions Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} et Cl^- qui comme décrit précédemment, est modifiée lors d'inflammation (augmentation de Cl^- et Na^+ et baisse de Ca^{2+} et K^+). Elle peut être mesurée à l'aide d'un conductimètre lors de la traite, et à l'avantage de pouvoir être réalisée assez facilement en élevage. Elle peut donc être mesurée deux fois par jour garantissant un diagnostic précoce des infections. L'inconvénient de cette méthode est que la conductivité du lait est

variable d'une brebis à l'autre, et qu'il faut par conséquent utiliser des valeurs de référence individuelles pour détecter une variation anormale de la conductivité. Cela est donc réalisable lors d'infection unilatérale où l'on compare la valeur du quartier sain à celle du quartier infecté chez la même brebis.

II. Etiopathogénie

Le risque infectieux est un équilibre entre l'agent infectieux (sa virulence, sa concentration) et les défenses de l'hôte. L'environnement peut intervenir en faveur ou contre l'un ou l'autre de ces facteurs. Cette partie est consacrée à la description des agents infectieux pouvant provoquer une mammite chez la brebis et aux mécanismes de protection développés par l'hôte pour la prévenir ou l'éliminer lorsqu'elle survient. Nous verrons ensuite les facteurs de risque pouvant faire pencher la balance en faveur de l'un ou de l'autre.

II.1. Facteurs infectieux

Les mammites des ovins sont presque exclusivement d'origine infectieuse et très majoritairement provoquées par des bactéries. Plus rarement, elles peuvent être provoquées par des champignons, des levures ou des virus.

II.1.1. Importance des différents germes

II.1.1.a. *Prévalence générale*

De très nombreuses espèces de bactéries peuvent être à l'origine d'une mammite chez la brebis. Certaines seront plutôt responsables de mammites cliniques et d'autres de mammites subcliniques. Leurs incidences respectives sont variables et dépendent de nombreux facteurs liés à l'animal (stade de lactation, race, statut immunitaire...), à l'environnement et à la conduite d'élevage. L'importance relative des germes qui sont le plus souvent impliqués dans les mammites ovines a été décrite.

Les bactéries à Gram-positif sont impliquées dans plus de 2/3 des infections mammaires, avec une très grande proportion de Staphylocoques. Les Staphylocoques coagulase négatifs (SCN) sont les principaux germes isolés, puisqu'ils représentent les premiers agents étiologiques des mammites subcliniques (Mørk et al. 2007), qui sont de loin les plus fréquentes. Les Staphylocoques coagulase-positifs (SCP), sont moins fréquents mais restent des agents

pathogènes majeurs. En effet, 98% des SCP sont représentés par *Staphylococcus aureus* (Malingue 2006), souvent isolé de mammites cliniques.

On retrouve également des Streptocoques, qui ont un rôle réduit chez la brebis, contrairement à la vache pour laquelle il s'agit d'un agent pathogène majeur.

Les autres bactéries Gram + pouvant être isolées sont *Bacillus cereus*, des Corynébactéries, des Entérocoques ou *Listeria monocytogenes*.

Les bactéries Gram- ont un rôle plutôt faible en général, sauf en élevage allaitant où les Pasteurelles sont des agents communs. On pourra retrouver des Entérobactéries (*Escherichia coli* majoritairement, mais aussi *Klebsiella spp* et *Serratia spp*) ou des Pseudomonas. Elles représentent 3% des germes isolés en élevage laitier (Gelasakis et al. 2015), et sont principalement des germes environnementaux.

II.1.1.b. Cas des mammites cliniques

L'agent principalement isolé est *Staphylococcus aureus*, aussi bien en élevage laitier qu'allaitant (Mørk et al. 2007). Sa prévalence varie selon les études, mais il serait retrouvé dans 16 à 80 % des cas de mammite clinique (Malingue 2006; Mørk et al. 2007; Baulez 2006; Bergonier et al. 1997; Gelasakis et al. 2015). Les mammites cliniques à *Staphylococcus aureus* sont très présentes dans les 15 jours qui suivent l'agnelage et leur plus forte incidence a lieu au début de la traite exclusive, généralement vers 31 à 45 jours après l'agnelage (Malingue 2006) et sur une durée d'environ un mois. D'autre part, les SCN peuvent être responsables de mammites cliniques, notamment en élevage allaitant (Mørk et al. 2007), avec des prévalences de 10,3 à 52,6% (Bergonier et al. 1997). Les Pasteurelles sont aussi des agents bien connus en élevage allaitant, alors qu'elles sont plus rares en élevage laitier. Les SCN et les Pasteurelles sont retrouvés surtout les 15 premiers jours après la mise bas, durant la phase d'allaitement.

Parmi les autres bactéries pouvant provoquer une mammite clinique, on retrouve des Streptocoques, qui donnent des cas sporadiques surtout lorsque l'hygiène du bâtiment est insuffisante, *Escherichia coli* ou *Pseudomonas aeruginosa*.

Même si elles sont la plupart du temps sporadiques, des épizooties de mammites cliniques sont possibles. Là encore elles peuvent être causées par *Staphylococcus aureus*, mais également des germes habituellement plus rares comme des Streptocoques, des Mycoplasmes, *Mannheimia haemolytica* ou le champignon *Aspergillus fumigatus*.

II.1.1.c. Cas des mammites subcliniques

Les SCN sont très majoritairement impliqués dans les mammites subcliniques, d'autant qu'ils peuvent persister longtemps dans la mamelle. Leur prévalence est en moyenne de 80 à 90% en France. *Staphylococcus aureus* peut aussi être isolé, en particulier dans le cas des mammites cliniques devenues chroniques. Les autres germes pouvant être isolés sont des Streptocoques, des Corynébactéries ou *Escherichia coli*. La prévalence moyenne des bactéries responsables de mammites subcliniques est présentée sur le graphique ci-dessous (Bergonier et al. 2003):

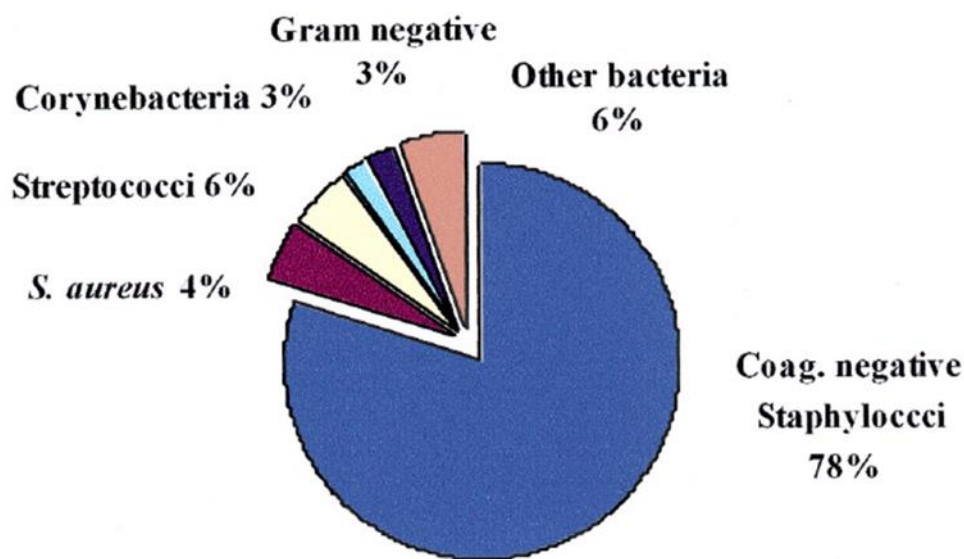


Figure 3 : Prévalence des bactéries impliquées lors de mammites subcliniques (Bergonier et al. 2003)

II.1.2. Les bactéries

II.1.2.a. Principales espèces bactériennes à l'origine de mammites

- **Staphylocoques coagulase négatifs :**

Comme indiqué précédemment, ce sont les germes qui sont le plus souvent isolés des mammites subcliniques, même s'ils peuvent être à l'origine de mammites cliniques subaiguës à aiguës. Ils sont de manière générale les premiers agents étiologiques de mammites chez les ovins (tous types bactériens confondus). L'espèce la plus souvent isolée est *Staphylococcus epidermidis* dans 30% des cas, surtout lorsque la mammite est clinique (Baulez 2006). Les autres espèces pouvant être isolées, responsables de mammites subcliniques en général, sont

Staphylococcus chromogenes, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus lentus* et d'autres plus rares (Gelasakis et al. 2015).

Les facteurs de virulence des SCN les rendent moins pathogènes que les SCP, mais ils sont tout de même responsables de lésions ayant un impact fort sur la quantité et la composition du lait (Burriel 1997). Ces germes sont d'autre part très difficiles à éliminer de manière définitive et l'efficacité des traitements antibiotiques conventionnels est limitée. De plus, ils peuvent persister longtemps dans la mamelle, y compris durant la période sèche qui est de longue durée dans cette espèce, et réapparaître sous la forme d'une mammite clinique à la lactation suivante.

- ***Staphylococcus aureus* :**

C'est le principal germe responsable des mammites cliniques. Il induit des mammites aiguës à suraiguës, voire gangreneuses, associées à une atteinte clinique marquée à sévère. L'hyperthermie peut être très élevée (jusqu'à 41°C), et le sepsis qui s'ensuit rapidement létal. Des formes chroniques sont possibles à la suite d'un épisode clinique peu marqué. Les modifications morphologiques de la mamelle sont alors souvent profondes avec une atrophie, une induration du parenchyme et des abcès de tailles variables. Il est également responsable d'infections cutanées sur la mamelle et les trayons (autres localisations possibles) avec différentes formes : dermite pustuleuse, folliculite/furonculose ou abcès cutanés.

Cette espèce comporte 4 groupes, basés sur le locus *agr* (accessory gene regulator), codant pour des facteurs de virulence : I, II, III, IV. Les groupes I et III ont été identifiés comme les plus fréquemment isolés lors de mammite, ainsi que dans les cavités nasales (Gelasakis et al. 2015).

Staphylococcus aureus est capable de produire différentes enzymes et toxines qui lui permettent de coloniser les tissus, ce qui explique la survenue de la septicémie et du choc septique. Parmi les toxines décrites, on trouve les hémolysines α et β , à action cytotoxique, ou les entérotoxines (notamment l'entérotoxine C) pouvant être responsables de toxi-infection chez l'homme ; elles ont donc une grande importance sanitaire, d'autant plus que certaines sont thermostables et résistent à la pasteurisation (Contreras et al. 2005).

- **Le genre *Streptococcus* :**

Ce sont des germes commensaux de la peau et des muqueuses pouvant provoquer des mammites cliniques ou subcliniques de manière opportuniste chez les ovins. Leur rôle est mineur contrairement à ce qui a été décrit chez la vache laitière avec une prévalence forte de

mammites à *Streptococcus uberis*. Ce dernier est également isolé chez la brebis, tout comme *Streptococcus agalactiae* et *Streptococcus suis*.

- ***Mannheimia haemolytica* :**

Les mammites provoquées par *Mannheimia haemolytica* sont surtout des mammites cliniques, souvent unilatérales, sévères, nécrotiques ou gangréneuses. Elle peut plus rarement être à l'origine de mammites subcliniques. Il s'agit d'une bactérie commensale du tractus respiratoire. Elle est notamment présente dans la cavité buccale des agneaux (muqueuse nasale et amygdales), ce qui explique sa prévalence bien plus élevée en élevage allaitant et le fait qu'elle est plus fréquemment isolée des mammites survenant durant la phase d'allaitement en élevage laitier (prévalence <5% (Malingue 2006)). Bien qu'opportuniste, cette bactérie montre une certaine virulence car elle peut adhérer aux cellules épithéliales grâce à des antigènes capsulaires ; elle montre une certaine résistance à l'action du système immunitaire. En effet, sa capsule et les protéines exprimées sur sa membrane externe lui permettent de résister à la phagocytose et elle peut exercer une activité cytotoxique sur les granulocytes neutrophiles grâce à la production d'une leucotoxine. Par ailleurs, la sévérité des signes cliniques s'explique par l'activité endotoxinique de son LPS, à l'origine de manifestations systémiques et d'un choc septique.

D'autres bactéries de la famille des Pasteurellacées peuvent être isolées comme *Pasteurella multocida*, mais elles sont beaucoup plus rares.

- **La famille des *Enterobacteriaceae* :**

Ce sont des germes mineurs des mammites cliniques et subcliniques chez les ovins. Parmi ces bactéries, on retrouve principalement *Escherichia coli*, qui représente 80% des isolats de ce type (Malingue 2006). C'est un germe très présent dans les litières, responsable la plupart du temps de mammites aiguës, plus rarement chroniques, plutôt en début de lactation et au tarissement. Elle peut coloniser l'organisme grâce à des facteurs de virulence qui lui permettent également d'échapper au système immunitaire. Son pouvoir pathogène lui est conféré par les toxines protéiques qu'elle peut produire et au LPS responsable d'un choc septique (Ramond 2015).

Serratia marcescens est également parfois retrouvée. Elle n'est pas très pathogène, mais les mammites qu'elle provoque sont très difficiles à traiter, entraînant des traitements longs et coûteux.

- **Le genre *Corynebacterium* :**

Ces bactéries ne sont généralement pas pathogènes, sauf quelques-unes à l'origine de mammites subcliniques, voire cliniques chez les ovins, comme *Corynebacterium mastiditis* et *Corynebacterium bovis* (Gyles et al. 2010).

- **Le genre *Pseudomonas* :**

Ce sont des agents pathogènes opportunistes, peu fréquents (environ 1% des mammites chez la brebis). Parmi eux, on trouve *Pseudomonas aeruginosa*, qui peut poser problème car elle représente un contaminant de la viande et des produits laitiers. Les mammites induites sont souvent suraiguës, pouvant entraîner la mort de la brebis (Baulez 2006). Leur pouvoir pathogène est attribué à l'activité endotoxinique de leur LPS et à l'activité cytotoxique de l'exotoxine A. Des formes chroniques sont ensuite possibles avec des remaniements importants tels que de la sclérose de la citerne et des abcès multiples profonds ou superficiels. Elles sont de plus difficiles à éliminer en raison de nombreuses résistances aux antibiotiques parmi ceux disponibles en médecine vétérinaire.

- **Le genre *Mycoplasma* :**

Il s'agit des mycoplasmes impliqués dans le syndrome de l'agalactie contagieuse : *Mycoplasma agalactiae*, majeur chez les ovins, ainsi que les mycoplasmes du groupe mycoïdes (*Mycoplasma mycoides capri*, *Mycoplasma capricolum capricolum*, *Mycoplasma putrefaciens*), spécifiques des caprins et beaucoup plus rares chez les ovins.

L'agalactie contagieuse est un syndrome regroupant des atteintes mammaires, articulaires et oculaires. Son évolution est enzootique et chronique, et sa gravité clinique est variable selon les animaux infectés. C'est sur les femelles en lactation que l'on observe les symptômes les plus typiques (Bergonier, Berthelot, Poumarat 1997). Au niveau mammaire, une hypogalactie brutale apparaît pouvant aller jusqu'à l'agalactie, associée à une mammite uni ou bilatérale avec induration et abcès. Les symptômes articulaires sont surtout fréquents chez les caprins ; il s'agit d'arthrites ou de polyarthrites déformantes des carpes ou des torses, avec des conséquences fonctionnelles sévères, surtout chez les jeunes animaux. Les atteintes oculaires sont plus rares mais peuvent toucher toutes les catégories d'âge ; elles sont caractérisées par une kérato-conjonctivite ulcéreuse, d'évolution favorable et spontanée. Des atteintes respiratoires sont possibles mais très rares chez les ovins (broncho-pneumonie). De façon accessoire, on peut avoir des avortements ou de la diarrhée chez le jeune.

Lors de la contamination d'un troupeau sain, on aura soit une épizootie soudaine et explosive, soit une atteinte successive de petits groupes d'animaux (Bergonier, Berthelot, Poumarat 1997). Le germe est ensuite très persistant et des flambées épizootiques peuvent survenir au sein des troupeaux contaminés de manière enzootique, notamment autour du part, où l'on peut avoir des résurgences d'infections antérieures.

En France, cette maladie est depuis longtemps enzootique dans les Pyrénées Atlantiques et reste aujourd'hui une maladie dont l'impact économique est non négligeable dans ce département.

- **Autres bactéries :**

De très nombreuses autres bactéries peuvent être isolées de mammites. On pourra citer en autres :

- *Enterococcus spp* (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* (Gelasakis et al. 2015)), qui sont des germes opportunistes
- *Bacillus cereus*, qui provoque des mammites gangreneuses, souvent inoculé lors de l'administration de traitement intra-mammaire dans de mauvaises conditions d'hygiène.
- *Listeria monocytogenes*, qui est d'une grande importance sanitaire à cause des toxico-infections alimentaires qu'elle peut induire après consommation de produits laitiers contaminés
- *Trueperella pyogenes*, qui est lui aussi un germe opportuniste

II.1.2.b. Réservoirs et modes de transmission

Différents réservoirs de bactéries à partir desquels les brebis peuvent être contaminées sont présents dans leur environnement. Les brebis elles-mêmes constituent un réservoir majeur, tout d'abord par les bactéries commensales qu'elles abritent. Il s'agit principalement de bactéries opportunistes, qui peuvent infecter la mamelle à la faveur d'une baisse de l'immunité de l'animal ou de l'action de facteurs extérieurs favorisant. On trouve donc des bactéries commensales de la peau et des muqueuses comme *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Corynebacterium spp.* ; du tube digestif et de l'appareil urinaire comme *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.* ; ou encore de l'appareil respiratoire comme les *Pasteurellaceae*. D'autre part, les organes infectés, et notamment la mamelle (et les lésions des trayons dans le cas de *Staphylococcus aureus*) sont des sites de multiplication et d'excrétion du germe. Ensuite, l'environnement contient de nombreux réservoirs en commençant par la litière, les fourrages

(ensilés pour *Listeria monocytogenes*) ou le matériel, et en particulier les équipements de traite, qui peuvent garder de l'eau résiduelle entre les traites où peuvent subsister *Pseudomonas spp* ou *Pasteurella spp*.

La transmission des agents pathogènes peut donc se faire de manière directe, par contact entre les animaux (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*) ou via la tétée qui transmet des germes commensaux de la bouche des agneaux à la mamelle (*Pasteurella spp.*). De même, les agneaux dits voleurs de lait qui vont d'une brebis à l'autre exacerbent ce phénomène en transmettant les germes des mamelles infectées.

De manière indirecte, la transmission peut se faire via l'environnement, notamment par contact avec la litière (*Escherichia coli*) ou par le partage des lieux de nourriture (*Mycoplasma spp* en estive). Le matériel est également un très bon vecteur de germes et les équipements de traite comme les manchons trayeurs jouent un rôle essentiel en élevage laitier. La transmission de bactéries au cours de la traite, par le contact avec les mêmes manchons trayeurs éventuellement contaminés, concerne notamment *Staphylococcus spp*, l'agent étiologique principal, ainsi que les bactéries ayant une bonne capacité de survie dans l'eau résiduelle des manchons, comme cités précédemment.

II.1.3. Les champignons et les levures

Les mammites mycosiques sont très rares comparées aux mammites bactériennes. *Aspergillus fumigatus* est le principal représentant des agents fongiques de mammites chez la brebis. Bien qu'il soit peu fréquemment isolé, des épizooties post-partum sont possibles. Les mammites aspergillaires apparaissent en début de campagne laitière, entre 1 et 21 jours après l'agnelage (Baulez 2006). Il s'agit de mammites cliniques plutôt aiguës, avec atteinte clinique, et il n'est pas rare que l'infection diffuse à d'autres organes. Les mammites sont caractérisées par une hypertrophie indurative et déformante de la mamelle, appelée aussi « pis de bois ». Ces mammites peuvent devenir chroniques, avec de nombreux abcès en chapelet en position parasagittale.

Les mammites fongiques seraient dues en grande partie à de mauvaises conditions d'hygiène lors de l'administration des traitements antibiotiques au tarissement (absence de désinfection du trayon avant application). De plus, ces spécialités ne contiennent souvent pas de substance antifongique, les antibiotiques inhibent donc la croissance bactérienne au profit

des espèces fongiques. Ceci expliquerait les rares épizooties que l'on peut observer dans les élevages pratiquant un traitement systématique lors du tarissement (Baulez 2006).

Les réservoirs d'*Aspergillus* sont les fourrages et la paille notamment s'ils ont été récoltés humides, mais également l'eau résiduelle des manchons trayeurs entre les traites.

II.1.4. Les virus

Parmi les agents viraux, seul le Virus Maëdi-Visna (MVV) est considéré comme pouvant être directement responsable de l'apparition d'une mammite.

C'est un rétrovirus du genre Lentivirus, comme le Virus de l'Arthrite et Encéphalite Caprine (CAEV), son équivalent chez la chèvre. Ces deux virus sont regroupés sous le nom de Small Ruminant Lentivirus, car des infections croisées entre les hôtes spécifiques de chacun d'entre eux sont possibles.

Il infecte préférentiellement les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, induisant un syndrome subclinique, chronique et débilitant (Gomez-Lucia, Barquero, Domenech 2018). Ce syndrome regroupe des atteintes respiratoires, nerveuses, mammaires et articulaires. Chez les brebis, les symptômes respiratoires sont prédominants avec une pneumonie interstitielle, consécutive à l'infiltration du septum inter-alvéolaire par des leucocytes.

L'atteinte mammaire est la seconde forme la plus fréquente. Elle touche principalement des adultes entre 3 et 5 ans, et apparait souvent suite à la parturition. Là aussi, une infiltration interstitielle chronique du parenchyme mammaire par des cellules mononuclées, responsable des lésions de l'épithélium canalaire, qui évoluent en fibrose à la phase chronique. Les signes sont une mammite subclinique, avec une induration diffuse de toute la mamelle, associée à une hypertrophie des nœuds lymphatiques rétro-mammaires. La production de lait est diminuée, sa composition est modifiée avec une augmentation de la CCS. De plus, les lésions facilitent la pénétration des bactéries, ce qui fait du MVV un agent prédisposant aux mammites.

II.2. Mécanismes protecteurs et réponse immunitaire

Les défenses de l'hôte comportent en premier lieu des mécanismes physiques et chimiques qui empêchent la pénétration des germes dans la mamelle. Lorsque cela n'est pas suffisant, des mécanismes immunitaires se mettent en place, mobilisant des effecteurs de l'immunité innée mais aussi de l'immunité adaptative.

II.2.1. Défenses passives

Le trayon constitue le premier moyen de défense de la mamelle vis-à-vis des infections. En effet, sauf dans de très rares cas de contamination hématogène, le trayon est le seul moyen d'accès entre le milieu extérieur et la mamelle, ce qui en fait un passage obligé pour les micro-organismes. Un de ses rôles est donc d'empêcher la pénétration des germes au sein de la glande mammaire par différents mécanismes fondamentaux (Gourreau 1995).

Tout d'abord, l'extrémité du trayon est fermée par un sphincter, avec un muscle annulaire depuis la base du trayon jusqu'au canal. Celui-ci forme une barrière efficace contre l'entrée des bactéries en obstruant l'extrémité du canal. Il se relâche lors de la traite ou de la tétée pour permettre l'éjection du lait ; cependant il existe une latence puisqu'il ne se referme totalement que deux heures après son ouverture, l'intervalle de temps étant propice à l'entrée des germes. (Nickerson, Akers 2011)

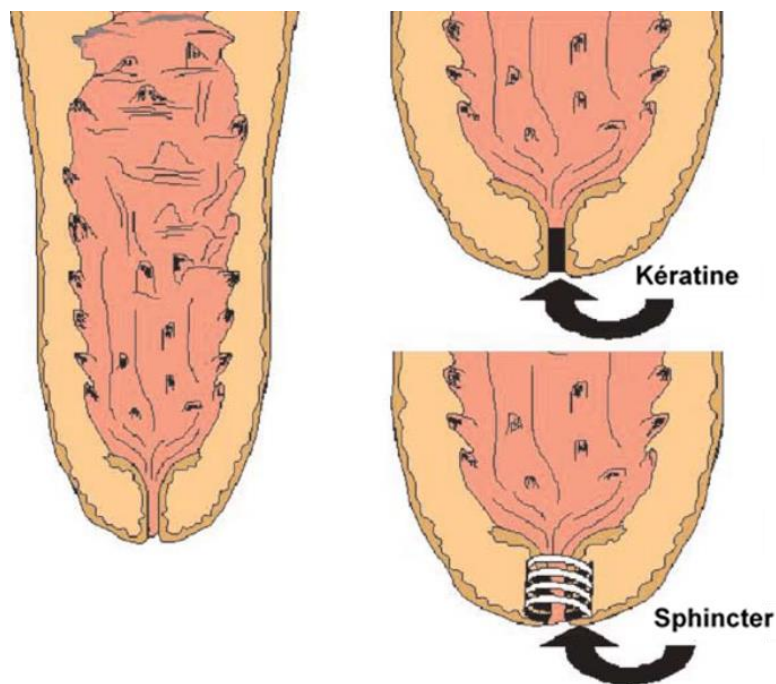


Figure 4 : Sections longitudinales de trayon montrant la surface interne de kératine et le sphincter (Nickerson 2011)

La surface interne du canal du trayon est tapissée de nombreux replis qui s'emboîtent les uns dans les autres lorsque le sphincter se ferme, gênant la progression des germes. Associée à ces replis, la couche superficielle de cette surface interne est imprégnée de kératine. Celle-ci forme un maillage qui comble le canal du trayon entre les traites (Zecconi et al. 2002). Les

agents pathogènes y adhèrent difficilement, ce qui ralentit d'autant plus la progression des germes.

D'autre part, les cellules épithéliales produisent des lipides (en particulier des triglycérides et des acides gras) et des protéides avec une action bactéricide. On les retrouve sur l'épithélium externe et interne bien qu'elles soient prédominantes sur l'épithélium interne. Leur réaction face à une colonisation bactérienne est rapide et intense (Ezzat Alnakip et al. 2014), afin d'ajouter une activité anti-microbienne contre les bactéries emprisonnées au sein du maillage de kératine.

Enfin, à chaque traite, l'éjection du lait produit un flux et un effet de chasse sur les germes qui seraient parvenus à coloniser le trayon.

II.2.2. Mécanismes immunitaires

Lorsqu'un micro-organisme réussit à dépasser les moyens physiques et chimiques de défense du trayon, la réponse immunitaire prend le relais en faisant intervenir divers types cellulaires et des éléments solubles qui agissent en synergie.

L'activation du système immunitaire peut se faire de manière efficace et précoce en regard de la rosette de Fürstenberg, un tissu lymphoïde situé à la jonction entre le canal et la citerne du trayon. Cette structure forme des replis muqueux et abrite un certain nombre de composants immunitaires comme des lymphocytes, des granulocytes, des cellules mononuclées phagocytaires et des immunoglobulines (Aştı et al. 2011). Lors d'infection, cette structure s'hyperplasia et le nombre de cellules augmente fortement, ce qui confirme sa capacité réactive et son rôle protecteur. Le déclenchement d'une réponse précoce et intense du système immunitaire est nécessaire, car la faible concentration en leucocytes de la glande saine n'est pas suffisante à prévenir l'infection (Ezzat Alnakip et al. 2014) ; en outre, les fonctions des cellules du lait sont moins efficaces que celles du sang.

Deux grands mécanismes de l'immunité interviennent au cours de cette réponse : les versants innée et adaptatif, qui sont parallèles et complémentaires et que l'on décrit séparément pour des raisons didactiques.

II.2.2.a. *L'immunité innée*

L'immunité innée est la première à apparaître lors de l'infection par un micro-organisme. Elle repose sur la reconnaissance des agents pathogènes par des cellules phagocytaires et par le complément. Cette reconnaissance implique majoritairement des

récepteurs PRR (Pattern-Recognition Receptors) présents sur la membrane externe des cellules phagocytaires, capables de reconnaître des ligands communs à plusieurs types d'agents, que l'on appelle les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern). L'immunité innée fait intervenir des éléments cellulaires tels que les granulocytes neutrophiles, les macrophages et les monocytes, les cellules Natural Killer (NK), les cellules épithéliales et divers éléments solubles comme le complément et autres substances anti-microbiennes.

Les macrophages représentent le type cellulaire prédominant dans le lait d'une glande saine. Suite à l'étape de reconnaissance, la bactérie est internalisée et lysée. La phagocytose et la bactéricidie sont les principaux mécanismes d'élimination des germes, mais les macrophages dégradent également de façon indifférente des cellules mortes et des débris divers. En revanche, ils sont impliqués dans l'activation d'autres mécanismes. En effet, lorsqu'ils sont activés par les bactéries, ils produisent diverses substances (cytokines, médiateurs lipidiques) qui vont initier l'inflammation et d'autres processus immunitaires. Certaines vont donc induire la phase vasculaire de l'inflammation, avec l'augmentation de la perméabilité vasculaire, nécessaire au passage de nouveaux effecteurs cellulaires et solubles. D'autres molécules, les chimiokines, ont une activité chimiotactique qui va permettre le recrutement massif de granulocytes neutrophiles depuis le sang. Les macrophages sont également des cellules présentatrices d'antigènes, c'est-à-dire qu'elles peuvent activer certains lymphocytes impliqués dans l'immunité adaptative en leur présentant des peptides obtenus par dégradation des antigènes protéiques de la bactérie.

Les granulocytes neutrophiles sont en petit nombre dans les mamelles saines mais ils sont recrutés en grande quantité lors d'infection ; ce recrutement est proportionnel à l'intensité de l'inflammation et ils peuvent représenter jusqu'à 90% des cellules somatiques (Targowski 1983). Ce sont les premières cellules immunitaires recrutées dans la glande infectée, dès les premières heures de l'infection. Les neutrophiles migrent par chimiotactisme depuis la moelle osseuse où ils sont produits : circulants dans le secteur vasculaire, ils peuvent suivre un gradient de facteurs chimiotactiques émis à hauteur du site infecté, ce qui provoque leur migration vers ce site. Lorsque ce recrutement est intense, le nombre de neutrophiles circulants peut même décliner en parallèle, car la moelle ne parvient pas à suppléer le déficit. Parmi ces facteurs, on retrouve des chimiokines produites par les macrophages et les neutrophiles, des éléments du complément (C5a) et des molécules libérées par les bactéries elles-mêmes (Sordillo, Shafer-Weaver, DeRosa 1997). Les neutrophiles sont fondamentalement impliqués dans l'élimination des germes du fait de leur nombre et de leur capacité de phagocytose, qui est supérieure à celle des macrophages. Certaines cytokines, comme l'IL-1 et TNF α , intensifient leur activité

bactéricide (Albenzio et al. 2012). En plus de la phagocytose, les neutrophiles libèrent des peptides antimicrobiens, tel que le lysozyme, la lactoferrine ou des cathélicidines, notamment au moment de leur mort par apoptose. Ces substances sont en partie responsables des lésions du parenchyme mammaire et de la dégradation des composants du lait (Ezzat Alnakip et al. 2014).

Les autres cellules phagocytaires sont les cellules dendritiques et les monocytes. Les monocytes sont les précurseurs sanguins des macrophages. Ils sont recrutés comme les neutrophiles par chimiotactisme, mais en quantité nettement moindre. Les cellules dendritiques font partie intégrante des épithéliums et jouent le rôle de cellules présentatrices d'antigènes pour l'initiation de la réponse adaptative.

Les cellules NK sont les seuls lymphocytes de l'immunité innée. Elles peuvent exercer une activité cytotoxique sur les bactéries ou les cellules altérées, en l'absence de présentation d'antigène par les cellules phagocytaires, principalement par libération après dégranulation de protéines cytolytiques.

Enfin, les cellules épithéliales mammaires jouent un rôle essentiel dans les premiers stades de la réponse innée. En effet, elles possèdent de nombreux récepteurs capables de reconnaître les motifs des agents pathogènes. Lorsqu'elles entrent au contact de ces motifs, elles produisent différentes substances impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires, des protéines de la phase aiguë, des cytokines et des peptides antimicrobiens. Beaucoup de ces composants qu'elles produisent se retrouvent au sein des membranes des globules gras, ce qui est un moyen indirect de les isoler pour les quantifier. Parmi eux, on trouve notamment des cathélicidines et des protéines S100 (Addis et al. 2013). Celles-ci ont une activité pro-inflammatoire et chimiotactique et participent au recrutement important des neutrophiles. Les cathélicidines ont aussi une activité lytique sur les bactéries (on les retrouve d'ailleurs en grande quantité dans les granules des neutrophiles, comme cité plus haut). A l'inverse, les composants habituellement synthétisés dans les conditions physiologiques (protéines, lipides et enzymes du lait) sont sous-exprimés.

Parmi les éléments solubles, le complément joue un rôle prépondérant à la fois dans le cadre de l'immunité innée que celui de l'immunité adaptative. Il s'agit d'un ensemble de protéines au sein d'une cascade enzymatique, nommées de C1 à C9, avec trois rôles principaux : i) l'opsonisation des particules étrangères, ii) leur lyse et iii) une action pro-inflammatoire

(Targowski 1983). Leur concentration augmente fortement lors d'infection, notamment via la diffusion depuis le sang.

L'opsonisation met en jeu l'élément C3b du complément (aussi appelé opsonine), capable de se lier à la surface des bactéries. Les cellules phagocytaires possèdent un récepteur spécifique du complément, le CR (complement receptor), capable de reconnaître le C3b fixé sur un agent étranger à l'organisme. Les éléments C3a et C5a du complément sont eux des anaphylatoxines, médiateurs vaso-actifs qui augmentent la perméabilité vasculaire et favorisent le recrutement des neutrophiles et des monocytes. Enfin, les éléments du complément peuvent lyser directement les bactéries en se liant entre eux et en formant ainsi un complexe d'attaque membranaire. Cette lyse peut également avoir lieu par association aux anticorps (qui sont les produits de l'immunité adaptative, voir ci-dessous).

Les autres éléments solubles sont des molécules bactéricides, bactériostatiques ou immuno-régulatrices produites par les cellules immunitaires et/ou les cellules épithéliales. On peut citer entre autres (Ezzat Alnakip et al. 2014) :

- Les cytokines, peptides qui interviennent à tous les stades de l'inflammation.
- La lactoferrine, qui exerce un effet bactériostatique et amplifie l'activité des cellules immunitaires (macrophages, cellules NK)
- Le lysozyme à effet bactéricide, agissant en synergie avec le complément, la lactoferrine et les immunoglobulines
- La transferrine à activité bactériostatique, recrutée à partir du sérum lors d'inflammation
- Le système lactoperoxydase et myéloperoxydase : la lactoperoxydase est l'enzyme la plus abondante dans le lait, dont le taux augmente lors de mammite. La myéloperoxydase est une enzyme similaire, localisée principalement dans les granules des neutrophiles. A elles deux, elles interviennent dans l'un des mécanismes antimicrobiens des neutrophiles.

II.2.2.b. *L'immunité adaptative*

L'immunité adaptative repose sur la reconnaissance spécifique de l'agent pathogène pour une élimination sélective. Les éléments représentatifs de cette réponse sont les lymphocytes et les immunoglobulines, mais elle fait également intervenir des éléments de l'immunité innée. Celle-ci se met en place de manière retardée par rapport à l'immunité innée, surtout lors du premier contact avec cet agent, mais la capacité de mémoire des lymphocytes

leur permet de répondre plus rapidement et plus intensément aux micro-organismes qu'il a déjà combattus.

Les lymphocytes sont catégorisés en lymphocytes T CD4+ ou T CD8+ et en lymphocytes B. Les lymphocytes T CD4+, dits aussi lymphocytes auxiliaires, sont capables de reconnaître de façon spécifique l'antigène présenté par les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques et macrophages). Ils s'activent alors, prolifèrent et activent à leur tour d'autres cellules immunitaires telles que les lymphocytes B, les lymphocytes T CD8+, les macrophages ou la diapédèse des neutrophiles via des cytokines (Sordillo, Shafer-Weaver, DeRosa 1997).

Les lymphocytes T CD8+, aussi appelés lymphocytes cytotoxiques, sont en nombre supérieur aux lymphocytes T CD4+ dans la mamelle, contrairement aux proportions observées dans le sang. Ils induisent la mort des cellules présentant des anomalies, c'est-à-dire infectées, endommagées ou trop âgées. Ils peuvent aussi agir en régulant la réponse immunitaire pour prévenir tout emballement.

Les lymphocytes B peuvent jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigène pour les lymphocytes T CD4+, qui les activent en retour. Ainsi activés, ils se différencient en plasmocytes, qui sont les cellules sécrétrices d'immunoglobulines dirigées contre l'agent pathogène en cause.

Les immunoglobulines, aussi appelées anticorps, sont des glycoprotéines regroupées en quatre classes possédant différentes fonctions effectrices : les IgG, IgM, IgA et IgE. Elles sont produites localement au sein des tissus (IgA et IgM) ou transportées depuis le sang soit de manière sélective vers la mamelle (IgG1), soit après captation par les neutrophiles sanguins lorsqu'ils sont recrutés (IgG2) (Sordillo, Shafer-Weaver, DeRosa 1997). Excepté lors de la synthèse du colostrum, leur concentration est physiologiquement basse au sein d'une mamelle saine, mais elle est fortement augmentée lors d'inflammation par diffusion avec le plasma. Leurs fonctions interviennent à la fois dans le cadre des deux versants innée et adaptatif de l'immunité. Comme le C3b du complément, les IgG et les IgM sont capables d'opsoniser les bactéries, seuls ou avec le complément, et sont reconnus par les cellules phagocytaires qui vont l'internaliser. On a ainsi une amplification de la phagocytose et de la destruction des micro-organismes. Les IgG et les IgA peuvent se fixer à des toxines ou à des antigènes bactériens pour neutraliser leur activité ; elles peuvent par exemple neutraliser les protéines nécessaires à l'adhésion et ainsi empêcher leur progression. Les IgE, à la suite de la liaison à un antigène

vont, elles, activer la dégranulation des mastocytes qui contiennent des molécules pro-inflammatoires dans leurs granules, notamment de l'histamine.

Ensemble, les mécanismes des versants inné et adaptatif de l'immunité agissent donc de concert et mettent en jeu de multiples fonctions, parfois redondantes afin d'éliminer les micro-organismes de façon optimale. Cette régulation est rendue possible par l'intervention de nombreuses cytokines qui vont entre autres stimuler l'activité de certaines cellules, les recruter ou induire leur différenciation. Elles forment un réseau complexe primordial à la bonne coordination et à l'efficacité des réponses immunitaires anti-infectieuses.

II.3. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux qui prédisposent aux mammites sont étroitement liés aux pratiques et à la conduite d'élevage. Cela commence par le type de logement : la conduite du troupeau en bâtiment constitue un facteur de risque d'apparition des mammites comparée à l'élevage à l'extérieur (Cooper et al. 2016). En effet, ce risque est étroitement corrélé à la densité qui augmente fortement en période d'agnelage avec la présence de nombreux agneaux, le plus souvent au cours d'une courte période. La pression d'infection augmente ainsi brutalement et, avec elle, le nombre de mammites.

La prolificité joue également un rôle dans les infections mammaires d'une part parce qu'elle conditionne la densité dans le bâtiment, mais aussi en augmentant le risque de transmission des bactéries présentes dans la bouche des agneaux, notamment *Mannheimia haemolytica*, au moment de la tétée. Le nombre d'agneaux élevés au-delà de deux est un facteur augmentant ce risque, en plus de l'allongement de la période d'allaitement (Gelasakis et al. 2015). La présence d'agneaux voleurs augmente le risque d'échange de germes d'une mamelle à l'autre et entre brebis.

La qualité des fourrages et de la paille est importante. Un ensilage mal conservé peut être une source de *Listeria*, tout comme de la paille ou du fourrage humide peuvent être une source de contamination par *Aspergillus fumigatus*.

Comme décrit précédemment, la machine à traire représente à elle seule un risque de transmission de germes à cause de l'utilisation des mêmes faisceaux trayeurs entre brebis saine et infectée, d'autant plus que, contrairement aux vaches laitières, il n'y a pas de nettoyage et désinfection des trayons chez la brebis avant le branchement des manchons trayeurs. Ce risque

peut être amplifié par de mauvais réglages de la machine à traire. En effet, un niveau de vide ou un rythme de pulsation mal réglés peuvent induire des micro-lésions des trayons, tels que des micro-hémorragies, des érosions et des gerçures, qui les fragilisent et les rendent plus réceptifs aux infections cutanées. Ces effets sont bien décrits chez la vache laitière mais les données sont plus rares pour les petits ruminants pour connaître leur réelle importance (Bergonier et al. 1997). Un mauvais programme de nettoyage des équipements de traite peut laisser des germes s'accumuler dans les tuyaux ou les manchons, ce qui augmente d'autant le risque de transmission lors des traites suivantes (Gelasakis et al. 2015). Ce programme comprend une pression et une température suffisantes de l'eau au cours des différents cycles de lavage, ainsi qu'une quantité appropriée de solution de base ou d'acide en alternance, qui doit être ajustée en fonction de la dureté de l'eau de lavage.

Certaines pratiques de traite peuvent être à risque. Lors de la traite à la main, les mains du trayeur peuvent véhiculer des Staphylocoques et les transmettre entre brebis. Lors de la traite mécanique, la sur-traite peut induire des lésions des trayons. La sous-traite est également fréquente chez la brebis en raison de la morphologie des mamelles qui ont souvent un branchement des trayons sur le pis qui est plus haut que la partie la plus ventrale de la citerne du lait (partie glandulaire du conduit lactifère). Sans intervention de l'éleveur, cela entraîne une rétention mammaire qui sert de support à la multiplication bactérienne en cas d'infection. Des pratiques comme l'égouttage ou le retrait des faisceaux sans coupure du vide sont responsables du phénomène d'impact, c'est-à-dire de la propulsion de petites quantités de lait dans le trayon controlatéral, consécutive à une entrée d'air. Des germes présents dans le canal du trayon ou dans le lait peuvent alors être introduits directement dans la citerne (Ezzat Alnakip et al. 2014).

D'autre part, bien qu'ils soient censés être un moyen de prévention des mammites, on a pu voir que les traitements au tarissement pouvaient avoir l'effet inverse à celui recherché s'ils sont réalisés dans de mauvaises conditions d'hygiène. Il s'agit notamment de l'absence de désinfection du trayon avant l'injection, de lésions induites par l'embout des seringues de traitement fragilisant les défenses basses du canal du trayon, ou de l'injection partielle de la dose préconisée. Les agents prépondérants associés à ces pratiques sont principalement *Aspergillus fumigatus* et *Bacillus cereus* (Bergonier et al. 1997).

Enfin, la gestion des mammites dans le troupeau est importante. Nous avons vu que les glandes infectées constituent des réservoirs à partir desquels les autres brebis peuvent être contaminées. Ainsi, la persistance des mammites constitue un facteur de risque puisque l'excrétion de bactéries perdure dans le temps. Cette persistance dépend de la précocité de

détection des mammites par l'éleveur et de la précocité de leur élimination, soit par traitement, soit par réforme immédiate.

II.4. Facteurs liés à l'hôte

Il s'agit de tous les facteurs qui vont altérer les défenses locales et systémiques de la brebis la rendant plus réceptive et/ou sensible aux infections mammaires et aux mammites.

Cet ensemble de facteurs comprend tout d'abord des facteurs susceptibles de compromettre l'efficacité des défenses physiques du trayon. La conformation du pis influe sur la réceptivité aux infections par les micro-organismes environnementaux. Ainsi, des trayons anormalement longs et/ou orientés horizontalement sont plus susceptibles d'être en contact avec les membres postérieurs de la brebis, et plus souvent souillés par de la matière organique ; une mamelle profonde et pendante aura tendance à la rétention de lait (Gelasakis et al. 2015). Ainsi, certaines caractéristiques morphologiques ont été associées à des CCS significativement plus élevés, tel que : la distance plancher-aine et plancher-trayon, la hauteur de l'attache arrière et l'angle de l'attache avant pour la mamelle et la longueur et la courbure du trayon (de CREMOUX et al. 2018).

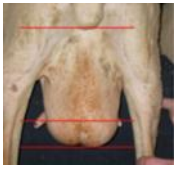





	Distance plancher-aine et plancher trayon	Angle de l'attache avant	Longueur et courbure du trayon
Typologie à risque			
Conformation recherchée			

Figure 5 : Facteurs de risque morphologiques associés à des CCS significativement plus élevées (CREMOUX et al. 2018)

De même que la machine à traire ou les traitements intra-mammaires provoquant des lésions tel qu'évoqué précédemment, une lésion du trayon peut servir de réservoir de germes et de source de contamination ultérieure. La sécheresse de la peau, les gerçures, les crevasses sont autant de lésions cutanées qui diminuent les défenses locales, notamment chimiques, et la quantité de bactéries présentes sur l'épiderme augmentent d'autant plus le risque d'infection (Mavrogianni et al. 2006). La carence en vitamine A peut altérer la structure et la fonction de barrière de l'épithélium (Gelasakis et al. 2015).

Le statut sanitaire du troupeau module aussi cette sensibilité puisque certaines affections ou maladies à tropisme mammaire et cutané peuvent léser la peau et permettre ainsi la formation de réservoirs de germes, telles que la Staphylococcie cutanée, l'Ecthyma contagieux ou la Papillomatose. De plus, l'éruption des incisives chez les agneaux a lieu aux alentours de trois semaines d'âge ; pour les brebis qui allaitent leurs agneaux plus de trois semaines, la tétée peut provoquer l'apparition de lésions traumatiques. Cette période correspond au second pic d'incidence des mammites entre trois semaines et un mois après l'agnelage ; elle est également concomitante du début de la traite exclusive.

D'autre part, tout facteur affectant le système immunitaire peut accroître la prédisposition aux mammites. Nous avons vu que leur prévalence était la plus élevée dans les jours suivant l'agnelage. Cela est en partie dû aux changements physiologiques qui surviennent à la parturition. L'activité cytotoxique des lymphocytes CD8+ serait d'ailleurs moins efficace durant cette période, contrairement au milieu de la lactation (Ezzat Alnakip et al. 2014). Le parasitisme, notamment par les strongles gastro-intestinaux, occasionne une spoliation des nutriments, qui affecte le bon fonctionnement de la réponse immunitaire, et il est fréquent qu'elle soit altérée à cette période, comme le montre l'augmentation de l'excrétion des œufs de strongles lorsqu'ils sont présents. La prévalence des mammites subcliniques est plus élevée chez les brebis infestées par des nématodes, et elle est d'autant plus forte que le taux d'infestation est élevé (Kordalis et al. 2019). Le virus de l'Ecthyma contagieux et le Papillomavirus ont des effets systémiques en plus de leurs effets locaux. Le Papillomavirus diminue notamment les populations de cellules présentatrices d'antigènes (Mavrogianni et al. 2006). Le Parapoxvirus de l'Ecthyma contagieux possède lui des gènes immuno-modulateurs qui perturbent les mécanismes immunitaires et inflammatoires.

Enfin, il existe des facteurs génétiques de susceptibilité aux mammites. La sélection génétique en production laitière inclut depuis quelques années le critère de résistance aux

mammites. Elle a aussi permis l'identification de gènes impliqués dans la sensibilité des brebis vis-à-vis des mammites, qui est le support de ce travail expérimental.

III. Méthodes de lutte et moyens de prévention

III.1. Méthodes de lutte conventionnelle en élevage

Comme souvent pour les affections collectives, la lutte contre les mammites consiste en la mise en place à la fois de moyens curatifs et préventifs.

III.1.1. Traitements curatifs

Compte tenu du fait que les germes responsables de mammites sont essentiellement des bactéries, les traitements utilisés sont très largement représentés par les traitements antibiotiques. Les modalités de traitement sont variables, et se basent notamment sur le type de mammité concernée. Ainsi, on pourra utiliser des spécialités intra-mammaires et/ou injectables par voie systémique, voire les deux selon l'intensité des signes cliniques observés.

Lors de mammites cliniques, la réussite du traitement va reposer sur une mise en place précoce, dès l'observation des premiers signes cliniques (Mavrogianni et al. 2011). En effet, si l'on veut espérer une restauration de la fonction mammaire, il faut minimiser les lésions parfois irréversibles, qui adviennent très tôt dans le cours de l'infection. Les traitements systémiques seront utilisés lorsque des symptômes généraux apparaissent ou si les signes locaux sont marqués à sévères, ou lors d'infection aiguë où le risque de bactériémie est élevé. On y associe la plupart du temps un traitement intra-mammaire pour optimiser l'action locale.

La voie intra-mammaire peut être utilisée seule lors de symptômes fonctionnels ou locaux mineurs. En raison du faible éventail de spécialités intra-mammaires avec une AMM pour l'espèce ovine, il est courant d'utiliser des spécialités initialement destinées aux bovins. En ce qui concerne les bonnes pratiques pour l'utilisation des antibiotiques, il faudrait, dans l'idéal, effectuer un traitement ciblé avec un spectre d'action étroit. Cela sous-entend d'effectuer une analyse bactériologique pour connaître l'agent causal et de réaliser un antibiogramme. Cependant, comme on vient de l'expliquer, il faut agir le plus précocement possible lors de mammité clinique, et le traitement utilisé est souvent un traitement de première intention à spectre large. Les prélèvements pour bactériologie du lait sont tout de mêmes utiles

afin d'identifier les germes présents dans le troupeau ou encore les résistances aux antibiotiques en cas de rechute ou d'échec du traitement.

L'utilisation d'un AINS comme traitement adjuvant permet de réduire la durée ou l'intensité des signes cliniques, grâce à leur action antipyrétique, analgésique et anti-inflammatoire. La flunixin méglumine a notamment fait l'objet d'une étude ayant démontrée que son association au traitement antibiotique permettait une meilleure guérison clinique comparé à un traitement antibiotique seul (Fthenakis 2000).

Dans le cas d'une mammité subclinique, le traitement a souvent lieu en fin de lactation au moment du tarissement. Seul le traitement local avec une spécialité intra-mammaire est utilisé en général, sauf lors de mammites chroniques avec des remaniements importants ou de nombreux abcès qui empêchent la diffusion des molécules antibiotiques localement ; les spécialités injectables sont utilisées dans le but d'atteindre le foyer par voie sanguine.

Le traitement au tarissement permet globalement un meilleur taux de guérison des mammites subcliniques et une baisse de l'incidence des nouvelles infections durant la période sèche ou en post-partum immédiat. On observe également un effet bénéfique pour la lactation suivante avec une production de lait plus élevée (Gonzalo et al. 2004) et un meilleur GMQ des agneaux. Deux grands modèles sont possibles : un traitement généralisé à tout le troupeau ou un traitement sélectif. Le traitement sélectif est le modèle maintenant privilégié ; il consiste à ne traiter que les animaux considérés comme infectés. Il est moins coûteux qu'un traitement généralisé et systématique. Il minimise le risque de résidus en début de lactation, même si cet écueil ne s'applique pas vraiment aux ovins, et va dans le sens des mesures à prendre pour un usage raisonné des antibiotiques et la prévention de l'antibiorésistance (Petridis, Fthenakis 2014). En revanche, les brebis non traitées ne sont pas protégées contre les nouvelles infections acquises pendant la période sèche. Les animaux à traiter sont choisis à la suite d'un examen clinique accompagné d'un examen par palpation des mamelles à la recherche de signes locaux, associés à un CMT ou une analyse bactériologique. Les CCS doivent être utilisées et interprétées avec prudence, puisque qu'elles augmentent physiologiquement en fin de lactation.

La posologie et la durée du traitement doivent être respectées, afin d'éviter les rechutes. En effet, malgré l'amélioration clinique, des bactéries peuvent survivre dans le parenchyme mammaire et se multiplier à nouveau à l'arrêt du traitement. L'utilisation d'antibiotiques non adaptés au germe peut être une cause d'échec, mais c'est surtout la non-diffusion de l'antibiotique dans les tissus lésés qui expliquent l'insuccès de ces traitements (Mavrogianni et al. 2011). Au moment de l'application, les trayons doivent être nettoyés et désinfectés (des lingettes désinfectantes sont généralement fournies avec les seringues) pour éviter

l'introduction de germes éventuellement présents à l'apex ou sur la peau des trayons, d'autant plus que les antibiotiques de ces spécialités ne sont pas efficaces contre *Aspergillus fumigatus* ou *Pseudomonas aeruginosa* (Petridis, Fthenakis 2014).

Les traitements systémiques ont l'avantage de ne pas présenter ce risque. De plus, les seringues intramammaires doivent être administrées sur une mamelle vide (suite à une traite complète) et cette opération doit être suivie de l'arrêt immédiat et définitif de la traite. Il faut éviter d'introduire la canule en entier pour éviter les lésions traumatiques du sphincter du trayon et l'intégralité du contenu doit être administrée ; l'utilisation d'une demi-seringue par hémimamelle est donc à proscrire. Cette pratique est souvent justifiée par l'emploi de seringues conçues pour les vaches, et contenant donc des doses adaptées à des quartiers beaucoup plus volumineux. Cependant, il faut respecter la posologie, même si le volume à traiter est en apparence plus petit pour éviter un sous-dosage et créer de nouvelles résistances (Mavrogianni et al. 2011). Une désinfection du trayon après le traitement est également recommandée, par pulvérisation ou trempage (Bergonier, Berthelot 2003).

Ces traitements ne dérogent pas aux discussions actuelles concernant l'antibiorésistance. L'utilisation massive des antibiotiques est aujourd'hui une réelle préoccupation. Dans le cas des mammites, des germes résistants peuvent être transmis à l'homme par l'intermédiaire de la consommation de produits laitiers. Les résistances aux antibiotiques sont répandues et retrouvées chez toutes les espèces bactériennes susceptibles d'être isolées lors de mammite. Des cas de résistances multiples sont aussi observés, avec une prévalence variable selon les études, allant de quelques rares cas à 17% (Azara, Piras, et al. 2017; Ceniti et al. 2017; Vasileiou et al. 2019). En ce qui concerne les Staphylocoques, agents pathogènes prédominants, on retrouve surtout des résistances à l'ampicilline, la pénicilline et la tétracycline, qui sont des antibiotiques couramment utilisés pour traiter les mammites (Azara, Piras, et al. 2017; Vasileiou et al. 2019). Les SCN montreraient plus de résistances que *Staphylococcus aureus*.

Une autre considération est à prendre en compte et concerne les résidus antibiotiques dans le lait, notamment pour le traitement pendant la lactation. En effet, l'utilisation de traitements intra-mammaires déterminés pour les bovins n'est pas transposable directement aux ovins pour lesquels le temps d'attente n'est pas connu avec certitude (Bergonier, Berthelot 2003). Plusieurs études ont étudié la cinétique d'excrétion des antibiotiques dans le lait chez la brebis à la suite d'un traitement intra-mammaire destiné à la vache. Ces études ont montré que des résidus étaient détectés jusqu'à 6 à 8 jours après la fin du traitement (Buswell, Barber 1989;

Molina et al. 2003; Pengov, Kirbis 2009), soit bien au-delà des temps d'attente recommandés par les fabricants. Le temps d'attente forfaitaire de 7 jours pour le lait doit donc être respecté chez la brebis.

Ces traitements antibiotiques ne suffisent pas à eux seuls à lutter efficacement contre les mammites. Ils doivent être inclus au sein de pratiques de prévention plus larges pour éviter l'apparition des infections mammaires.

III.1.2. Gestion d'élevage et hygiène de la traite

La lutte contre les mammites passe donc avant tout par de bonnes pratiques d'élevage et d'hygiène, qui sont indispensables pour une action préventive efficace.

La première mesure indispensable est l'élimination des sources animales pour endiguer la transmission des germes entre brebis, car c'est un phénomène qui exacerbe l'enzootie des mammites. Cela commence par une détection précoce des cas, avec la mise en place de dépistages réguliers au moins durant la période à risque (semaines suivant l'agnelage), avec des examens cliniques, des CCSi et des CMT (Bramis et al. 2018). La réforme est alors la mesure la plus efficace, à réaliser le plus tôt possible pour les mammites cliniques, soit après stabilisation de l'animal lorsque des signes généraux sont présents, ou en fin de campagne pour les mammites subcliniques afin de réduire les pertes de production laitière. Dès la détection de l'infection, les animaux doivent être séparés du reste du troupeau, même si la traite se poursuit jusqu'à la fin de la lactation ; ces animaux seront traités en dernier. Le traitement est aussi envisageable lorsque les lésions locales ne sont pas trop marquées, soit immédiatement pour une mammite clinique détectée très tôt, soit en fin de lactation pour les mammites subcliniques avec un traitement au tarissement. Il faudra tout de même envisager la réforme lors d'échec thérapeutique, de mammites chroniques ayant provoqué des lésions marquées à sévères (asymétrie des hémimamelles, induration, abcès...) (Gelasakis et al. 2015). D'autre part, il est aussi nécessaire d'isoler les animaux atteints de Staphylococcie cutanée ou d'Ecthyma contagieux (mères et agneaux) et de réaliser une antiseptie des trayons (Bergonier et al. 2003).

Les sources environnementales sont essentiellement maîtrisées par de bonnes conditions d'ambiance du bâtiment d'élevage. Ainsi, il faut maintenir une densité adéquate, en particulier durant la période de l'agnelage en utilisant les surfaces disponibles du bâtiment. On

recommande une surface de 1,5 à 2m² par brebis gravide ou suitée (normes communiquées par l'Institut de l'élevage, Idele). Il faut garantir une bonne hygiène de la litière par un paillage régulier et abondant, en utilisant de la paille de bonne qualité, associé à un curage et une désinfection fréquents (Bramis et al. 2018). A cela, on associera une ventilation et un renouvellement suffisants de l'air pour maintenir des valeurs d'hygrométrie et de température basses, permettant d'assécher la litière. Toutes ces mesures permettent d'abaisser la pression d'infection par les germes responsables de mammites.

Comme cela a déjà été bien décrit dans les paragraphes précédents, la traite joue un rôle clef dans la transmission des germes évoluant selon un mode contagieux. Le matériel de traite doit être révisé annuellement pour vérifier les différents paramètres (niveau de vide, pulsation, rapport succion/massage, ...) (Contreras et al. 2005), les manchons doivent être renouvelés régulièrement selon le matériau utilisé (tous les ans pour le caoutchouc, tous les deux ans pour le silicone). Le nettoyage de la salle et de la machine à traire est réalisé après chaque traite, et l'eau de lavage de la machine doit être de bonne qualité microbiologique; si une source différente de l'eau du réseau est utilisée, il faut réaliser des examens bactériologiques réguliers pour s'assurer de l'absence de bactéries, notamment fécales qui servent de révélateur d'une contamination de l'eau (Bramis et al. 2018).

Certaines techniques de traite sont à proscrire tel que le massage excessif, la sur-traite ou la sous-traite (à cause de la rétention de lait), ou encore le retrait des manchons trayeur sans arrêt du vide (Bergonier et al. 2003). L'antisepsie des trayons après la traite montre un bon effet préventif sur l'apparition des mammites. Même s'il peut être laborieux à mettre en œuvre, compte tenu de la cadence de traite dans les troupeaux ovins laitiers, le post-trempage peut être réalisé sur de courtes périodes, notamment celles qui sont le plus à risque comme le début de la lactation ou lors d'épizootie de mammites. Une attention particulière sera portée à la qualité du produit utilisé (son spectre d'action), et il doit être renouvelé à chaque traite pour ne pas devenir lui-même vecteur de germes (Contreras et al. 2005). Enfin, une autre procédure efficace consiste à hiérarchiser l'ordre de passage à la traite, en donnant la priorité aux brebis primipares *a priori* saines, suivies des brebis saines, pour terminer par les brebis infectées avec mammites et celles séparées du troupeau pour cause de mammites sévères en dernier. Ces procédures de traite doivent être enseignées à tous les intervenants de l'exploitation pour s'assurer que ces bonnes pratiques sont réalisées de façon systématique.

Enfin, le statut sanitaire général du troupeau doit être préservé, en commençant par une alimentation couvrant les besoins nutritionnels, de bonne qualité et de bonne appétence. Une vermifugation, ou à défaut un suivi de l'excrétion parasitaire, doit être envisagée après l'entrée en stabulation. Entre autres, il faut faire attention aux apports en vitamine A et en sélénium ; une supplémentation durant la gestation peut être nécessaire (Giadinis et al. 2011). Une vaccination contre l'ecthyma contagieux doit être envisagée dans les troupeaux infectés.

III.1.3. Vaccination

Comme pour les vaches laitières, il existe un vaccin visant à augmenter la protection immunitaire des brebis face aux infections mammaires. La plupart des vaccins étudiés et développés ciblent les Staphylocoques (Gelasakis et al. 2015). Ils peuvent être multivalents ciblant *Staphylococcus aureus* et certaines espèces de SCN, soit spécifiques de *Staphylococcus aureus*. Des vaccins contre d'autres pathogènes ont été étudiés, notamment contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Streptococcus uberis* mais ont peu d'importance en élevage ovin où ces germes sont peu fréquents et représentent des pathogènes mineurs comparés aux Staphylocoques.

Ces vaccins utilisent en général des polysaccharides capsulaires, des bactéries inactivées ou des anatoxines (α -toxine) (Pérez et al. 2009). La protection conférée repose probablement sur la production d'anticorps dirigés contre ces polysaccharides. La quantité d'anticorps produits est variable selon le polysaccharide en question et les adjuvants utilisés (Hadimli et al. 2005; Tollersrud et al. 2002). Le protocole vaccinal repose sur deux injections durant la gestation, la dernière ayant lieu à une date proche du part, pour une protection lors de la lactation suivante. Le protocole doit être renouvelé à chaque lactation.

Ces vaccins n'empêchent pas les nouvelles infections, mais ils permettent de réduire l'incidence des mammites à *Staphylococcus aureus*, et donc les mammites cliniques de manière générale (Contreras et al. 2005; Alekish et al. 2018; Hadimli et al. 2005), ainsi que les signes cliniques associés (Gelasakis et al. 2015). La prévalence des mammites subcliniques n'est donc pas réduite mais on observe une diminution des CCS du lait (Alekish et al. 2018).

Plus récemment, une étude a utilisé un vaccin dirigé contre les souches de *Staphylococcus aureus* exprimant des composants du biofilm. En effet, la matrice du biofilm contient entre autres du poly-N-acétyl- β -1,6-glucosamine (PNAG) (Pérez et al. 2009). Or cet antigène est particulièrement immunogène et la production d'anticorps dirigée contre celui-ci est déjà observée dans les conditions naturelles d'infection à *Staphylococcus aureus*. Il a de

plus l'avantage de ne présenter qu'une seule structure commune aux différentes souches de la bactérie, ce qui n'est pas le cas des polysaccharides de capsule utilisés dans les autres vaccins. Les anticorps produits assurent une protection de large spectre contre *Staphylococcus aureus* et probablement d'autres Staphylocoques ; c'est par ce moyen qu'il est supposé induire une baisse des CCS, une production laitière préservée et des lésions mammaires sensiblement moins fréquentes ou moins sévères. Un vaccin basé sur ce principe a été commercialisé (VIMCO®, laboratoire Hipra, Espagne) avec comme indication la réduction des mammites subcliniques causées par *Staphylococcus aureus*.

Des autovaccins peuvent être élaborés mais aucune étude n'a vraiment évalué leur efficacité. Des vaccins contre l'agalactie contagieuse sont aussi disponibles pour les troupeaux où la maladie est endémique et où l'éradication n'a pas été possible.

La vaccination ne semble pas un outil réellement efficace pour la prévention des mammites. Elle peut cependant être considérée comme une mesure complémentaire et se montrer utile lorsque la prévalence de mammites à *Staphylococcus aureus* est élevée. Elle n'est pas suffisante seule, mais elle doit être intégrée à un ensemble de bonnes pratiques décrites dans le paragraphe précédent. De plus, il faut toujours effectuer une vaccination sur des animaux en bonne santé et correctement vermifugés.

III.2. Sélection génétique pour une résistance accrue

III.2.1. Principes généraux de l'amélioration génétique en élevage

Sélectionner, c'est identifier les meilleurs individus pour les faire se reproduire. La sélection génétique en élevage a débuté dès le XX^e siècle avec une sélection sur des caractères physiques. Celle-ci a beaucoup évolué depuis les années 1950, grâce à l'arrivée de nouveaux outils techniques, informatiques et de nouvelles méthodes de reproduction, notamment grâce à l'insémination artificielle (IA). On a ainsi pu mettre en place une sélection plus rationnelle, avec des programmes à l'échelle nationale, selon les espèces et les productions considérées : l'évaluation des valeurs génétiques des individus est alors effectuée par contrôle de performances (*La révolution génomique animale* 2011). Ces programmes ont permis de grandes améliorations dans les domaines de l'élevage, mais montrent certaines limites de coûts, de temps et de moyens à mettre en œuvre. De nouvelles perspectives ont été permises par les

avancées scientifiques sur la structure, les fonctions et l'évolution des génomes. Cette branche scientifique est la génomique, permettant aujourd'hui une autre forme de sélection : la sélection assistée par marqueurs, qui cible directement les régions chromosomiques agissant sur les caractères que l'on souhaite améliorer.

III.2.1.a. *Notions préalables et sélection classique (La révolution génomique animale 2011)*

Depuis longtemps, l'homme sélectionne les animaux selon des caractères extérieurs, observables ou exprimables. Il s'agit alors de faire reproduire les animaux possédant les caractères répondant au mieux aux besoins de l'éleveur (travail, production laitière...).

La sélection en élevage débute donc par le choix des caractères à sélectionner. Ces caractères peuvent être quantitatifs, c'est-à-dire qu'ils se mesurent de façon objective, comme pour la morphologie, la production laitière etc... ou ils peuvent être fonctionnels et sont alors plus difficiles à apprécier, comme la longévité, la santé, la fertilité... Ces caractères sont en très grande majorité le résultat de l'expression d'un grand nombre de gènes, ayant des effets plus ou moins forts. La valeur génétique globale qui en découle provient de l'addition de leurs effets individuels (qualifiée de génétique additive) et des interactions entre eux. Seule la génétique additive est évaluée en sélection puisque c'est celle qui est transmise à la descendance.

Le phénotype d'un animal se définit comme « l'ensemble apparent des performances, résultant de l'expression du génotype et des effets du milieu sur différents caractères ». En sélection, on parlera plutôt *des phénotypes*, en relation à un ou plusieurs caractères. Il peut s'agir de mesures directes, comme pour les caractères de production, de notations subjectives, comme pour les caractères morphologiques mesurés par pointage, ou encore de mesures indirectes comme pour le caractère de résistance aux mammites estimé grâce aux CCS. Une fois que l'on a choisi un caractère à améliorer, il faut donc définir le ou les phénotypes les plus appropriés pour apprécier au mieux l'expression génétique du caractère en question. Ils doivent bien sûr être les plus précis possible, mais il faut aussi considérer la praticité et le coût de leur collecte. L'Institut de l'élevage et l'interprofession génétique s'accordent donc pour mettre en place des protocoles officiels de collecte, validés par le Ministère de l'Agriculture, définissant les objectifs et les procédures de collecte afin de standardiser les mesures. Ils permettent la précision la plus optimale pour établir une relation la moins biaisée entre le phénotype et le génotype sous-jacent, permettant ainsi d'estimer la valeur génétique d'un individu pour un caractère.

Cependant, un même génotype peut s'exprimer différemment selon le milieu dans lequel évolue l'animal. On parle d'effets de milieu, qui sont multiples : alimentation, logement, climat, conduites et pratiques d'élevage, etc... Ils influent par conséquent sur l'expression des phénotypes, que l'on peut matérialiser par la formule suivante :

P	=	G	+	E
Performance		Effet du génotype		Effet de milieu

En découle la seconde formule :

σ^2_p	=	σ^2_A	+	σ^2_e
Variabilité phénotypique		Variabilité génotypique additive		Variabilité due au milieu

Les avancées scientifiques ont permis d'estimer certains effets du milieu considérés comme majeurs (âge, stade physiologique, logement, alimentation, région d'élevage...). Cela permet une meilleure appréciation de la part imputable au milieu sur la variation des performances (et donc d'être plus précis sur celle imputable au génotype), tout en sachant qu'il restera une fraction d'erreur liée à l'individualité de chaque animal.

La notion d'héritabilité (h^2) d'un caractère est alors à prendre en compte. Sa valeur est comprise entre 0 et 1 et représente la part des variations des performances mesurées due aux variations de valeurs génétiques additives. On peut ainsi estimer l'importance relative de l'effet du génotype face aux effets de milieu sur l'expression phénotypique et donc avoir une idée de la plus ou moins grande facilité à améliorer un caractère (et estimer le progrès réalisable). En effet, une héritabilité faible ne signifie pas qu'il en soit de même de la variabilité génotypique (même si cela est possible) mais que celle-ci est peu visible dans un environnement donné, face à une variabilité

due au milieu qui est grande. Il faudra donc mettre en place des moyens plus performants pour obtenir le progrès génétique espéré.



Figure 6 : Effet du milieu sur le niveau d'héritabilité (La révolution génomique animale 2011)

III.2.1.b. *Les programmes de sélection*

Les programmes de sélection classiques reposent sur l'estimation de la valeur génétique d'un reproducteur à partir des performances observées sur lui-même et/ou sur des individus apparentés, et ce, sans information directe sur le génome. L'indexation permet de représenter cette valeur génétique par l'attribution d'un index relatif à chaque caractère inclus dans l'objectif de sélection.

Il existe différentes méthodes de sélection classique :

- Sur ascendance : on conserve les produits des meilleurs parents ; méthode la plus rapide, mais elle considère que tous les membres d'une fratrie sont égaux
- Sélection individuelle (ou massale) : efficace pour des phénotypes évaluables sur l'individu et ayant une héritabilité élevée
- Sélection sur animaux apparentés de la même génération : précision modeste
- Sélection sur descendance : on conserve les individus qui engendrent les meilleurs produits ; méthode ayant la plus grande précision mais qui est longue et coûteuse.

Les programmes de sélection peuvent utiliser chacune de ces méthodes, mais la sélection sur descendance reste le seul moyen d'être réellement efficace dans l'amélioration d'un caractère. Les candidats à la reproduction sont principalement de jeunes mâles puisque l'IA a permis une diffusion large et aisée de leur génétique. Ils sont évalués et triés en fonction des résultats des contrôles de performances effectués sur leur descendance. Seuls quelques candidats seront sélectionnés (environ 2% en bovin laitier), on comprend vite que ces programmes sont très coûteux et très longs (environ 6 ans pour sélectionner un taureau).

Le progrès informatique et notamment la méthode BLUP (best linear unbiased prédiction) dans les années 1980 a permis d'estimer à la fois les effets de milieu connus et les effets génétiques, tout en prenant en compte les liens de parenté des animaux évalués dans le calcul de l'index d'un reproducteur. Même s'ils sont très précis, les index ne représentent qu'une estimation de la vraie valeur génétique d'un individu. Chaque index est associé à un coefficient de détermination, compris entre 0 et 1, qui définit sa précision. Les éleveurs choisissent alors les reproducteurs qu'ils veulent faire accoupler en fonction de leurs index pour les caractères qu'ils souhaitent améliorer dans leur élevage.

Jusqu'au début des années 1990, les objectifs de sélection visaient surtout des caractères liés à la production (augmentation des quantités). De nos jours ils s'orientent de plus en plus vers des critères de qualité des produits et des critères fonctionnels. Ces derniers ont souvent subi une dégradation avec l'intensification de la production dans les élevages. En effet, la corrélation génétique est souvent défavorable avec les critères de production. C'est notamment le cas dans notre étude : la sélection pour des performances laitières s'est très probablement accompagné d'une baisse de la résistance aux mammites. Ceci s'accompagne également du fait que les demandes des consommateurs évoluent vers des produits de meilleure qualité et que les éleveurs aspirent à de meilleures conditions de travail et à une réduction des frais nécessaires à la production.

Ces nouveaux enjeux concernent des caractères plus difficiles à sélectionner, ayant souvent une héritabilité faible. C'est pourquoi la connaissance de plus en plus poussée et précise du génome et de son fonctionnement permet l'arrivée de nouvelles méthodes, capables de s'affranchir des effets du milieu en mesurant directement les effets génétiques. Cela donne la possibilité de sélectionner avec la même efficacité des caractères ayant une variabilité génétique identique mais des héritabilités différentes.

III.2.1.c. *Utilisation de la génomique pour la sélection*

La génomique est la branche de la génétique qui étudie le génome ; elle a pour but de déterminer la structure des gènes (génomique structurale), leurs fonctions (génomique fonctionnelle) et leurs mécanismes d'expression (génomique expressionnelle) (Jussiau et al. 2010). La sélection génomique au sens large est apparue dans les années 1980. Elle se caractérise par le développement de nouveaux outils, capables de mettre en évidence des

régions chromosomiques agissant sur certains phénotypes, et ce, grâce à des marqueurs génétiques identifiés (La révolution génomique animale 2011).

Un marqueur génétique moléculaire se définit comme une séquence d'ADN polymorphe, c'est-à-dire qui se présente sous plusieurs versions, appelées allèles. Ils sont, de plus, facilement et précisément repérables le long du génome et utilisés comme marqueurs pour suivre la transmission d'un segment chromosomique d'une génération à l'autre.

Il existe deux grands types de marqueurs :

- Les microsatellites : répétition d'une séquence d'un faible nombre de bases (Ex : la séquence CA se succédant n fois). Ils ont été beaucoup utilisés au début des années 2000 mais s'adaptent mal aux nouveaux outils technologiques et coûtent donc cher.

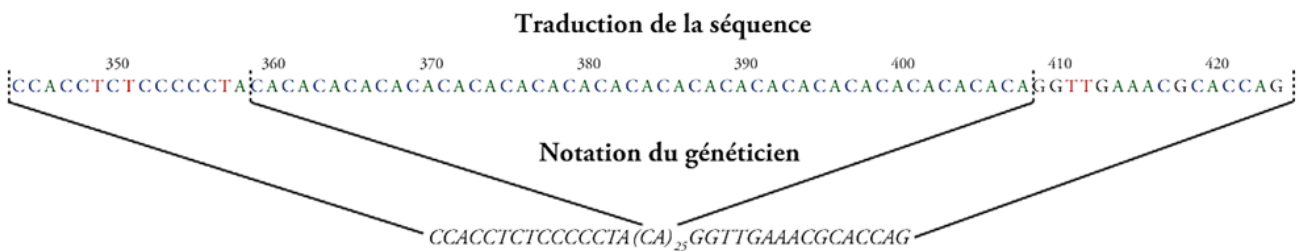


Figure 7: Exemple de marqueur microsatellite (La révolution génomique animale 2011)

- Les SNP (single nucléotides polymorphisms) : il s'agit de mutations ponctuelles, c'est-à-dire de versions différentes d'un seul nucléotide à un endroit précis du

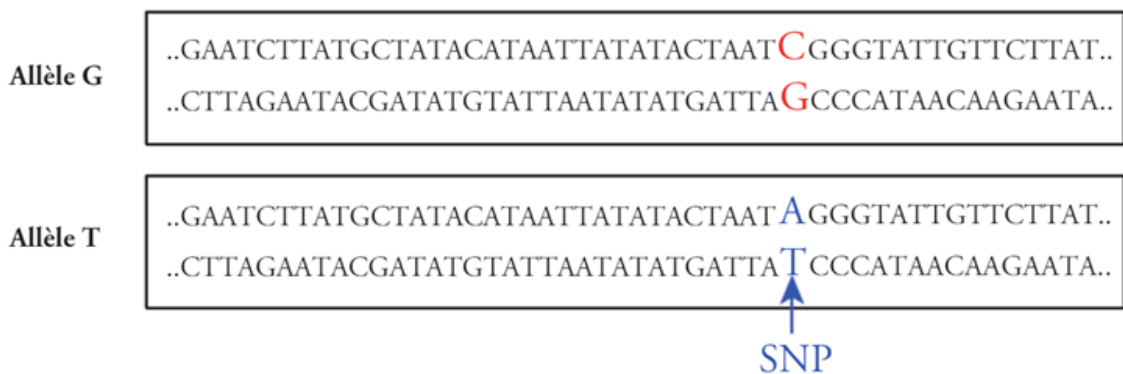


Figure 8 : Exemple de marqueur SNP (La révolution génomique animale 2011)

génomique. Ces variations de séquences étant rares, il n'y a souvent que deux allèles, l'allèle sauvage et l'allèle muté. Ces marqueurs, eux, s'adaptent très bien aux outils de génotypage à haut débit et sont donc majoritairement utilisés de nos jours.

Le polymorphisme de ces séquences permet d'établir l'origine parentale de tel ou tel allèle, et donc de distinguer quel chromosome a été apporté par la mère ou par le père (Jussiau et al. 2010).

Afin d'identifier efficacement les marqueurs présents dans une portion de génome d'un individu, des puces à ADN ont été développées. Elles sont constituées d'une lame sur laquelle ont été fixés les différents allèles de marqueurs génétiques connus, appelée sonde. Elles permettent d'identifier, parmi tous les marqueurs fixés sur la sonde, lesquels sont présents dans l'échantillon (portion d'ADN que l'on étudie). Ces puces se sont aujourd'hui largement développées ; elles peuvent contenir un très grand nombre de marqueurs (>50 000) et sont capables d'analyser plusieurs échantillons à la fois (*La révolution génomique animale* 2011).

En sélection, l'objectif est de situer les gènes responsables de la variabilité génétique d'un caractère. On définit alors un QTL (quantitative trait locus) comme une région chromosomique ayant un effet significatif sur un caractère donné. Cet effet se justifie par la présence d'un ou de plusieurs gènes d'intérêt, sans que l'on connaisse leur situation précise. Ces gènes peuvent être « d'effet majeur », si un seul gène explique une grande partie de la variabilité génétique du caractère, ou « d'effet faible » s'ils n'en expliquent qu'un faible pourcentage.

Pour détecter un QTL dont on ne connaît pas la localisation, on utilise des marqueurs proches, qui n'auront pas forcément d'effet sur le phénotype mais qui lui seront significativement associés. Afin de localiser au mieux les QTL, il est important de connaître la position d'un maximum de marqueurs uniformément répartis sur le génome. Pour cela, une cartographie génétique est établie en plaçant tous les marqueurs connus les uns par rapport aux autres, ce qui permet de vérifier que le génome est balisé en totalité (Boichard et al. 2011).

Pour être un bon marqueur de QTL, il faut d'abord que sa liaison avec celui-ci soit forte, c'est-à-dire qu'ils soient très proches. L'unité de mesure de la distance génétique est le centimorgan (cM), qui équivaut environ à 1 million de bases (Mb), en sachant qu'un génome

M étant très proche de A1, il y a de très fortes chances qu'ils soient transmis ensemble à la descendance, ce qui n'est pas forcément le cas de M et B1.

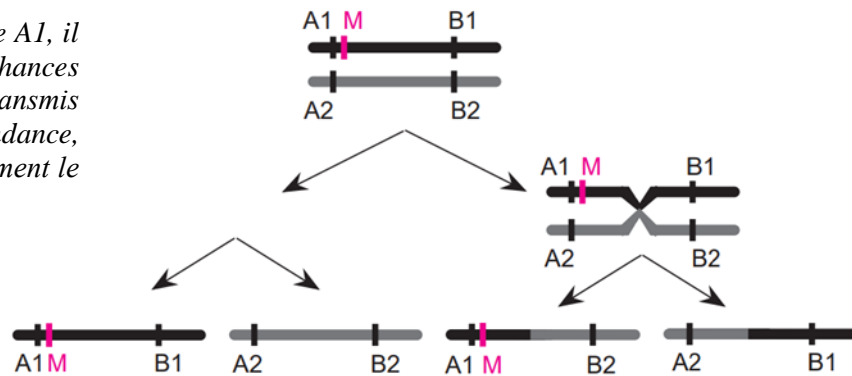


Figure 9 : Exemple de recombinaison au cours de la méiose (*La révolution génomique animale 2011*).

entier contient en moyenne 3 000 Mb (*La révolution génomique animale 2011*).

Ainsi, plus la distance QTL-marqueur est grande, plus la probabilité de recombinaison est grande, c'est-à-dire que des cassures et des échanges de fractions génomiques entre chromosomes d'une même paire peuvent survenir à n'importe quel endroit du génome lors de la confection des gamètes (méiose). *A contrario*, plus cette distance est faible (1 cM ou moins), plus on a de chance que cette association soit maintenue dans toute la population (faible risque de recombinaison), ce qui est indispensable pour identifier et sélectionner un QTL à grande échelle.

Ensuite, il faut que gènes et marqueurs soient en déséquilibre de liaison, c'est à dire qu'il existe une dépendance statistique entre eux (Jussiau et al. 2010). En d'autres termes, cela signifie que l'on a une association préférentielle entre un allèle du marqueur (que l'on sait identifier) et un allèle d'un QTL (que l'on cherche à sélectionner). Prenons l'exemple d'un marqueur M présent sous deux allèles M1 et M2, et d'un QTL Q présent lui aussi sous deux allèles Q1 et Q2. On aura déséquilibre de liaison si par exemple M1 est préférentiellement associé à Q1. Afin de sélectionner Q1 dans une population, ce que l'on ne peut pas faire directement puisque l'on ne connaît pas sa position, on va utiliser une méthode indirecte en sélectionnant les génotypes M1/M1. Si au contraire M1 ou M2 sont aussi bien associés à Q1 qu'à Q2, alors l'allèle de M ne permet pas de présumer celui de Q.

L'existence d'un déséquilibre de liaison entre deux loci est d'autant plus probable qu'il existe une liaison forte entre eux (faible distance génétique).

Ainsi, afin de mettre en évidence la présence d'un QTL ayant un effet sur un caractère d'intérêt on commence par :

① Mettre en évidence une liaison entre le polymorphisme d'un marqueur et les différents phénotypes observés (confrontation du génotypage des marqueurs et des données des contrôles de performance de plusieurs individus).

② Identifier un lien fort entre le polymorphisme d'un QTL et celui d'un marqueur que l'on sait facilement identifier (recherche d'un déséquilibre de liaison)

③ Les liens entre les allèles du QTL et les performances sont déterminés via les allèles du marqueur.

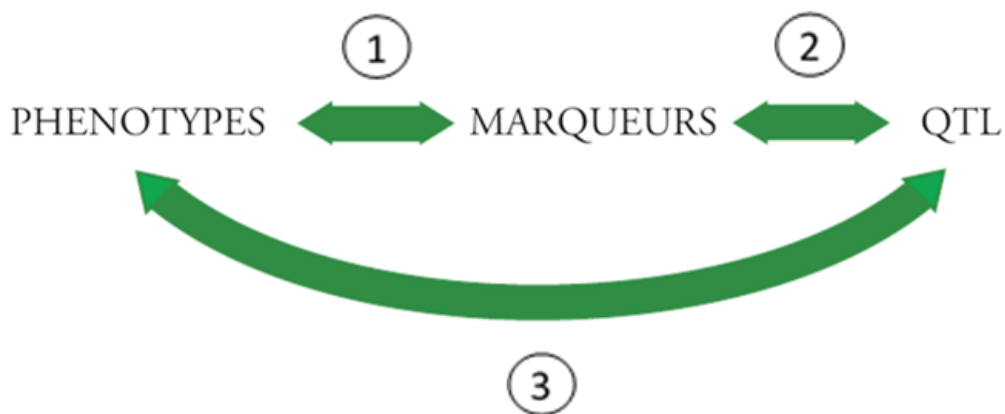


Figure 10 : Mise en évidence de la relation QTL-phénotype via les marqueurs (*La révolution génomique animale* 2011)

Pour les bovins laitiers, le développement de puces à SNP haut débit a permis dès 2008 de découvrir de nombreux QTL à partir des familles des meilleurs taureaux d'insémination, sélectionnés au départ par testage sur la descendance.

Pour chaque QTL, on connaît alors sa position dans le génome, la part de la variabilité génétique du caractère qui lui est imputable, et le nombre d'allèles qu'il comporte, chaque allèle étant associé à une traduction phénotypique. Une fois qu'un QTL est identifié, on va pouvoir chercher dans cette région des gènes candidats, puis par séquençage identifier la ou les mutations causales.

A partir de ces connaissances, la génomique peut être utilisée pour prédire la valeur génétique des individus, par identification directe des allèles qu'ils portent au sein de leurs génomes. Elle ne peut se mettre en place que dans le cas où l'on a une population de référence comportant un nombre d'individu assez grand, dont on connaît à la fois les génotypes et sur lesquels des relevés de performances précis ont été réalisés. Cette méthode peut alors s'appliquer dès la naissance, contrairement à la sélection classique sur descendance qui dure obligatoirement plusieurs années. Différents type de sélection s'appuient sur la génomique (*La révolution génomique animale* 2011) :

- **Sélection assistée par gène** : la ou les mutations des gènes responsables d'une grande part de la variabilité d'un caractère sont connue(s), et on les recherche directement par génotypage chez les reproducteurs. C'est la situation idéale, mais ces gènes sont peu nombreux à avoir été identifiés, car cela demande des recherches sur plusieurs années.

- **Sélection assistée par marqueurs (SAM)** : on va utiliser le lien marqueur-QTL. Considérons un gène d'intérêt pour un caractère donné présent sous deux allèles, l'allèle + étant améliorateur par rapport à l'allèle -, ainsi qu'un marqueur proche, lui aussi sous deux formes alléliques, A étant systématiquement associé à + et B étant associé à -. Leur liaison forte signifie que les gamètes produits par la population porteront l'association A+ ou B-. A partir du marqueur facilement identifiable par génotypage chez un individu, on peut facilement en déduire l'allèle du gène d'intérêt. Il s'agit donc de choisir les allèles favorables de tous les gènes que l'on souhaite sélectionner grâce à leurs marqueurs.

- **La sélection génomique** : c'est une variante de la SAM, qui cherche à utiliser le plus grand nombre de QTL présents dans le génome. Ainsi, elle prend également en compte les QTL qui n'ont pas pu être cartographiés avec précision, c'est-à-dire pour lesquels, aucun marqueur très proche n'a été trouvé, ou qui ne sont pas en déséquilibre de liaison avec leurs marqueurs. Cette sélection est rendue possible par le développement de modèles statistiques poussés.

Pour les bovins laitiers, la sélection génomique a connu un développement fort et rapide, et elle fournit aujourd'hui des index génomiques très fiables dès la naissance des reproducteurs, ce qui a conduit à un arrêt du testage sur descendance. Le contrôle de performance sur les filles est toujours réalisé, mais il a lieu après l'indexation par génotypage et la diffusion de la semence

à grande échelle ; il permet d'affiner l'index génomique et d'enrichir les données de la population de référence. Le progrès génétique annuel qui est permis est beaucoup plus grand comparé à la méthode classique (+84-88%) (Boichard 2014). Toutes les espèces et races d'élevage ont désormais accès à ces outils de sélection.

III.2.2. Objectifs de sélection chez la brebis laitière

On connaît en France trois grands bassins de production de lait de brebis, représentant 92% des élevages ovins laitiers français et regroupant cinq races locales (Villaret, Markey 2011)

:

- Le bassin de Roquefort avec la race Lacaune lait (LL)
- Les Pyrénées Atlantiques avec les races Manech tête rousse (MTR), Manech tête noire (MTN) et Basco-béarnaise (BB)
- La Corse avec la race Corse

La sélection ovine laitière a débuté dans le bassin de Roquefort dans les années 1970 (Lagriffoul et al. 2016). Son avènement s'expliquait par la diminution du nombre d'éleveurs dans les années 1960, associée à une baisse importante de la production laitière qui n'était plus suffisante pour produire la quantité attendue de fromage Roquefort. Tous les acteurs de la filière se sont alors mobilisés pour développer la production, via différents axes comme le développement de la traite mécanique, l'amélioration des systèmes d'alimentation et le développement de la sélection. En 1965, l'INRA acquiert le domaine de la Fage (Causse du Larzac) afin d'y installer une ferme expérimentale, où auront lieu de nombreuses activités de recherche et de développement, appliquées à la race Lacaune (*INRA 30 Ans De Recherches La Fage* 1995). Cette impulsion s'est rapidement étendue aux deux autres bassins avec l'élaboration de programmes de sélection classique adaptés à chaque race. Cela a été grandement facilité par l'arrivée de l'IA en élevage ovin vers la fin des années 60, avec la particularité de s'effectuer en semence fraîche sur une période très restreinte à cause de la conduite d'élevage saisonnière de cette filière (Astruc et al. 2016).

Le premier caractère à faire l'objet d'une sélection a été la production laitière dès les années 1970 pour la race Lacaune, puis en 1975 pour les races ovines laitières des Pyrénées (ROLP), et un peu plus tard en 1986 pour la race Corse (Villaret, Markey 2011) . Le critère enregistré était la quantité de lait fournie par une brebis à la traite, en s'affranchissant de la

période d'allaitement. Pour cela, le contrôle laitier officiel (CLO) a été mis en place sur le noyau de sélection représenté par 20% environ des troupeaux (Lagriffoul et al. 2016). Il a permis l'évaluation génétique (indexation) des béliers d'IA et de monte naturelle en enregistrant les performances de leurs filles.

Ainsi tous les ans, de jeunes béliers candidats à la sélection entrent en centres d'élevage vers 1 à 2 mois. Ils sont issus d'accouplements raisonnés, entre des pères à béliers (PAB), c'est-à-dire les meilleurs béliers d'IA, et des mères à béliers, c'est-à-dire les meilleures brebis du noyau de sélection. Entre 6 et 18 mois (selon la précocité de la race), leur semence est prélevée pour produire des doses de semence mais ils devront attendre l'âge de 2,5 ans avant de recevoir un index calculé à partir des performances de leurs premières filles. Sur la base de cet index, environ 50% d'entre eux deviendront alors des béliers d'IA ou de monte naturelle, et seuls quelques-uns deviendront des pères à béliers (les meilleurs) (Buisson, Astruc, Barillet 2018).

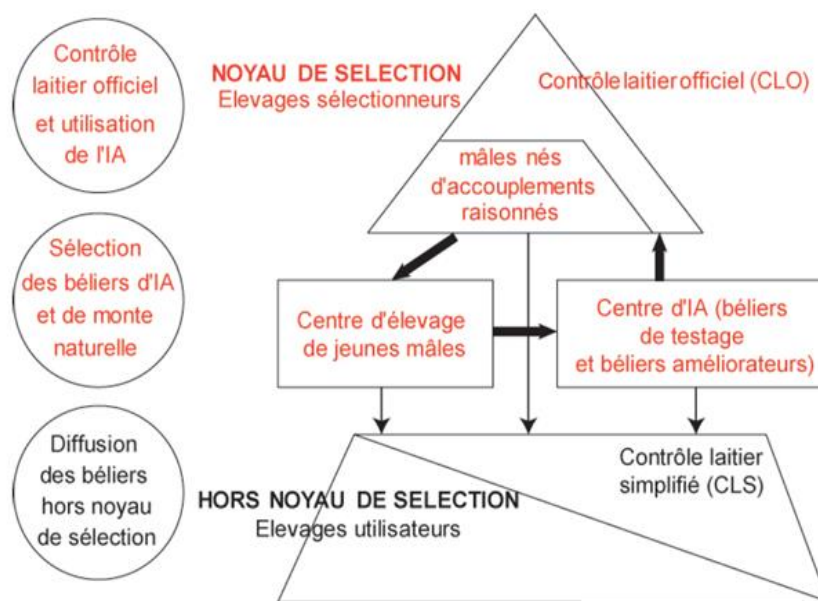


Figure 11 : Schéma de sélection classique en ovin laitier (Lagriffoul et al. 2016)

Le noyau de sélection génère donc des progrès génétiques de la race, qui profitent aux autres élevages par l'utilisation de l'IA ou par l'acquisition d'un bélier de monte naturelle. Ces derniers peuvent adhérer au contrôle laitier simplifié (CLS) qui est moins rigoureux que le CLO et permet aux éleveurs de gérer les performances relatives à leur élevage.

La sélection sur le caractère de production laitière a montré de très bons résultats et celle-ci n'a cessé de s'améliorer durant ces 50 dernières années : on observe une augmentation constante moyenne de 3,6%/an entre 1970 et 2014 (Lagriffoul et al. 2016).

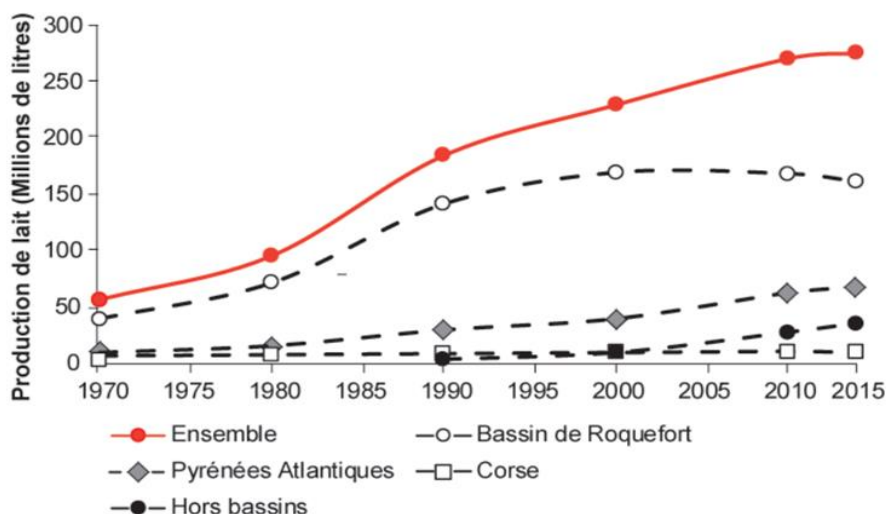


Figure 12 : Evolution de la production nationale de lait de brebis en France par bassin (Lagriffoul et al. 2016)

Cependant, la sélection sur le critère de production s'est accompagnée d'une baisse du taux de matière sèche du lait (TB+TP). Cela est dû au fait que ces deux caractères ont une corrélation génétique défavorable avec la production laitière. C'est ainsi que les caractères de composition sont entrés dans les objectifs de sélection dès 1987 (2000 pour les ROLP), avec la prise en compte des critères de TB/TP dans les grilles de paiement en 1995 dans le bassin de Roquefort. Le taux de matière utile a pu être stabilisé et progresse maintenant conjointement à

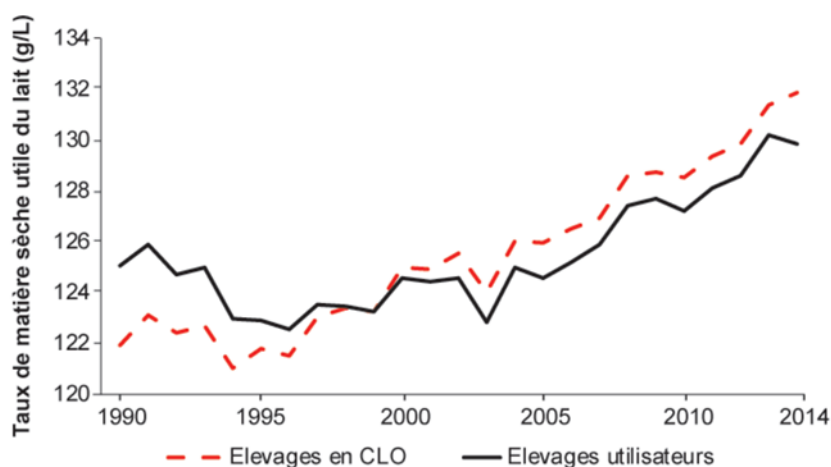


Figure 13 : Evolution du taux de matière sèche utile du lait collecté dans le Rayon de Roquefort (Lagriffoul et al. 2016)

la production laitière. Depuis, on se rend compte que d'autres caractères ont été détériorés de la même manière, comme la morphologie mammaire, qui a été intégrée aux programmes de sélection dans les années 90.

La santé mammaire a longtemps été étudiée, mais l'enregistrement des CCS a commencé dans les années 90, avec l'établissement des seuils d'interprétation (Berthelot et al. 2006). Depuis 2005, le caractère de résistance aux mammites est pris en compte dans l'index de synthèse ovin lait (ISOL) grâce à l'enregistrement des CCS. Depuis cette date, une baisse marquée des CCS moyens est constatée dans le bassin de Roquefort, là encore associée à une intégration du critère CCS parmi les critères de paiement du lait (Lagriffoul et al. 2016).

Aujourd'hui, les objectifs de sélection varient en fonction des races en raison d'un état d'avancement différent de la sélection entre les races : les caractères fonctionnels occupent 50% du programme de sélection de la race Lacaune, alors que les ROLP ne l'applique que depuis 2015. La race Corse ne prend en compte que la production.

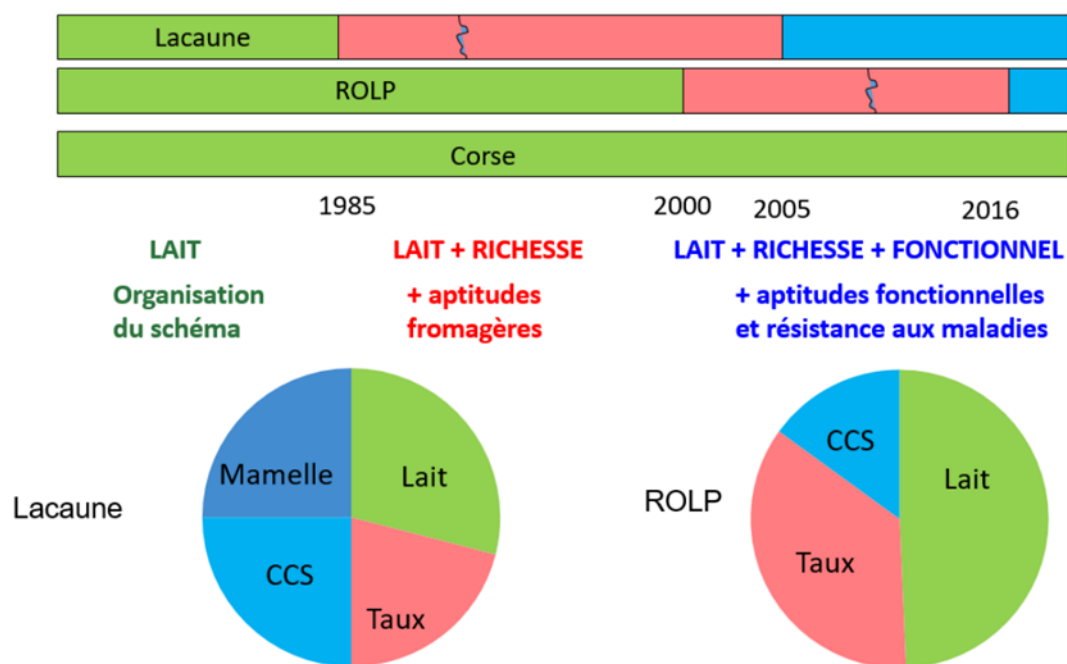


Figure 14 : Apparition successive des critères de sélection dans chaque bassin et leurs proportions actuelles en Lacaune et ROLP (Astruc, Buisson 2018)

Actuellement, les outils nécessaires à la mise en place de la sélection génomique en ovin sont disponibles (Astruc et al. 2016). En 2009, la première puce à ADN ovine a été développée : OvineSNP50, qui comporte 50 000 marqueurs SNP. Différents programmes de recherche ont alors débuté afin de l'appliquer dans les différentes races. Comme pour l'élaboration des

programmes de sélection classiques, leur efficacité est due à la participation conjointe des acteurs du secteur professionnel et de la recherche, avec notamment le partenariat entre l'INRA et l'Institut de l'élevage, regroupés au sein de l'UMT GGPR (unité mixte technologique gestion génétique et génomique des petits ruminants).

Pour appliquer la sélection génomique, il faut définir une population de référence, c'est-à-dire une population assez grande d'animaux pour lesquels on dispose à la fois des données sur leur génotype et leurs performances (afin de les mettre en relation). Il s'agit des béliers d'IA, qui sont testés sur descendance et qui sont génotypés à l'aide de la puce OvineSNP50. Les populations de référence que peuvent fournir les races Lacaune et MTR sont suffisamment grandes, mais ce n'est pas le cas pour les trois autres races. Des essais de sélection génomique multiraciale ont été envisagés en mettant en commun les effectifs de races très proches comme les races Manech et Laxta (race pyrénéenne espagnol), mais le gain génétique obtenu fut similaire à la sélection classique (Astruc et al. 2016).

Les premiers schémas de sélection génomique sont apparus dès 2015 pour la race Lacaune, et en 2017 pour les ROLP. Leur élaboration a dû prendre en compte les pics d'IA en semence fraîche imposés par la conduite d'élevage. En effet, les jeunes béliers sont sélectionnés par génotypage entre 6 et 18 mois et à cet âge, ils ne sont pas encore en mesure de produire suffisamment de semence pour toute la population (s'ils sont soumis à une pression de sélection de 50% comme pour la sélection classique). Les schémas élaborés sont donc mixtes, avec une première sélection génomique d' $1/2$ à $1/3$ pour les jeunes béliers triés selon leur index

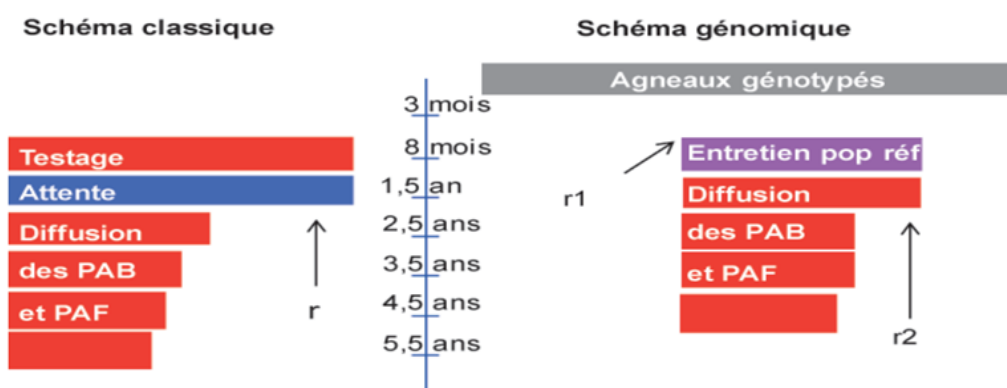


Figure 15 : Différentes étapes de sélection dans les schémas de sélection classique (Astruc et al. 2016)

r = taux de sélection après testage ; r1 = taux de sélection sur la base de l'index génomique, r2 = taux de sélection après confirmation sur descendance ; PAB = pères à béliers ; PAF : pères à brebis

génomique, ce qui permet de conserver un pool suffisamment grand de béliers d'IA en attendant le second tri à 2,5 ans par testage sur la descendance.

Le risque encouru par l'utilisation d'un nombre restreint de mâles est l'augmentation de la consanguinité dans la population qui est associée à la perte de variabilité génétique, comme cela a été le cas pour les bovins (Buisson, Astruc, Barillet 2018). Ce phénomène est moins marqué pour les ovins des races laitières car l'IA en semence fraîche et la pratique de la monte naturelle nécessite un nombre relativement grand de béliers. L'évolution de la consanguinité a pu être évaluée grâce à la généalogie des reproducteurs enregistrée depuis les premiers schémas de sélection. On observe un accroissement constant et modéré de la consanguinité de la race Lacaune et MTR, alors qu'il est fort dans les trois autres races, jusqu'à atteindre 5% de consanguinité en 2013 contre 2,5% dans la race Lacaune.

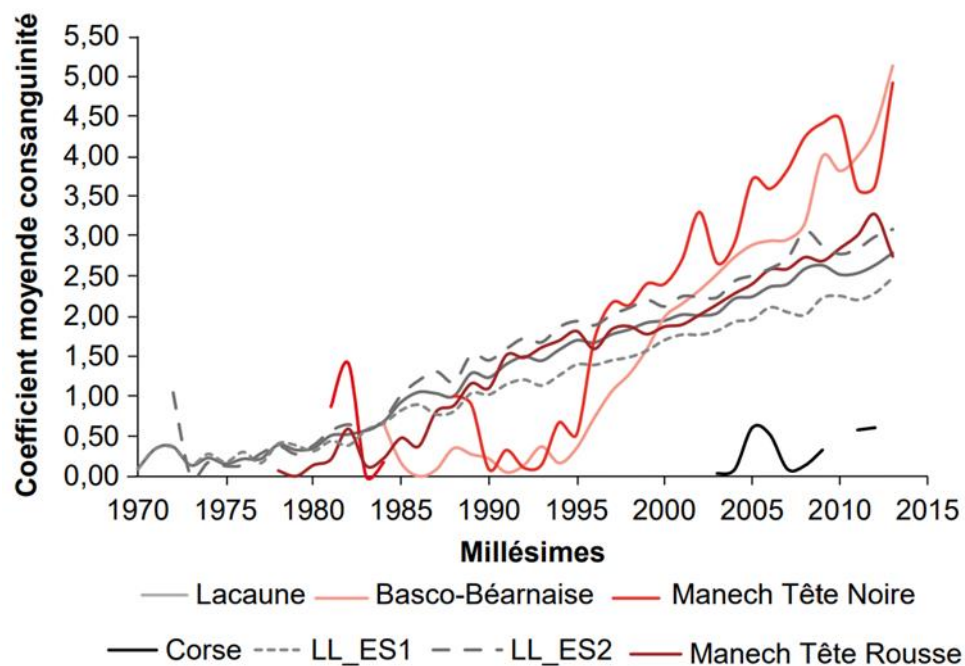


Figure 16 : Évolution de la consanguinité moyenne des béliers du noyau de sélection de 1970 à 2013 dans les 5 races ovines laitières (Buisson et al. 2018)

LL_ES1 et LL_ES2 = Entreprise de sélection Lacaune lait 1 et 2

Afin de préserver la variabilité génétique, les deux entreprises de sélection de la race Lacaune ont entrepris de gérer les mâles par famille, chacune étant constituée par les descendants d'un même grand-père paternel ou arrière-grand-père paternel. Ainsi, un seul individu par famille peut avoir le statut de père à bélier, lui-même remplacé par un seul de ses fils le moment venu. On évite également les accouplements entre individus possédant un ancêtre

commun sur les deux dernières générations. Ces mesures peuvent être appliquées en MTR mais plus difficilement dans les autres races compte tenu du faible nombre de familles disponibles.

La mise en place de ces nouveaux schémas de sélection génomique a permis un gain génétique annuel de 16 à 19% dans la race Lacaune, et de 17 à 33% en ROLP. Ils laissent la possibilité de sélectionner de nouveaux caractères encore à l'étude. Parmi eux, on peut citer la résistance aux parasites gastro-intestinaux, les caractères de robustesse et de rusticité (longévité et persistance laitière), et la composition fine du lait. On peut aussi citer des recherches menées chez les mâles et notamment la production de semence, dans un contexte où un grand nombre de doses doivent être produites à partir de béliers de plus en plus jeunes.

III.2.3. Application à la sélection sur la résistance aux mammites

Parmi les nombreuses études menées au domaine expérimental de la Fage, certaines ont porté sur la création de lignées divergentes en race Lacaune lait (Barillet et al. 2016). Il s'agissait pour un caractère donné, de constituer deux lignées à partir des meilleurs (lignée haute) et des plus mauvais (lignée basse) béliers d'IA, classés en fonction de leur ISOL pour ce caractère. Les deux premières lignées portaient sur le caractère de la quantité de lait produit et ont été constituées de 1989 à 2001. L'écart de niveau génétique obtenu entre elles était alors de 60 L de lait par lactation, ce qui équivaut à 10 ans de sélection pour ce caractère. L'objectif de cette longue étude était de mesurer des phénotypes non disponibles en CLO sur ces deux groupes, afin de voir si l'on observait des différences significatives qui révéleraient des corrélations génétiques entre la production laitière et d'autres caractères. Parmi ces derniers figure la résistance aux mammites. Ainsi, alors que les taux de mammites cliniques et chroniques étaient équivalents, l'incidence des mammites subcliniques a montré un écart de 42% entre les deux lignées. Il était devenu nécessaire de sélectionner les caractères fonctionnels mammaires qui se retrouvaient dégradés par la sélection sur le caractère laitier. C'est ainsi qu'en 1999, les CCS ont été inclus dans le CLO, de même que 3 à 4 pointages morphologiques mammaires. Leur héritabilité a été évaluée autour de 0,15 pour les CCS (Barillet et al. 2001), et de 0,26 à 0,35 pour la morphologie, indiquant une sélection possible avec de bons résultats espérés.

Selon le même principe, deux autres lignées divergentes ont été établies à partir de 2003 sur le caractère de la CCS, à même potentiel laitier pour s’affranchir des effets du caractère de production. Différentes mesures relatives aux infections mammaires ont été relevées, donnant des résultats très probants, exposés dans l’article de Rupp et al. 2009, dont les principaux sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Principales différences significatives observables entre lignées SCS+ et SCS-

Les SCS correspondent à une transformation logarithmique des CCS pour obtenir des valeurs normalisées

	Lignée SCS+	Lignée SCS-
Abcès mammaires	17.9%	0.9%
Bactériologies du lait positives	40%	21%
CCS (cel./mL)	858x10 ³	405x10 ³

Cette étude a également mis en évidence une durée d’infection supérieure chez les brebis de la lignée SCS+. Ces résultats confortent l’efficacité de la sélection sur la santé mammaire. Dès 2005, les éleveurs Lacaune ont choisi d’accorder un poids équivalent aux caractères laitiers et fonctionnels (Barillet et al. 2016). Depuis 2008, on observe un écart favorable d’environ 100 000 cel./mL de lait de tank entre les élevages du CLO et du CLS. En ROLP, le critère de la CCS a été introduit dans l’ISOL à partir de 2016.

En filière bovine laitière, où la sélection génomique s’est développée plus tôt que dans les races ovines, un gène responsable de la résistance aux mammites avait déjà été identifié. Il s’agit du gène FEZL, dont le polymorphisme est associé à des CCS plus ou moins élevées (Sugimoto et al. 2006). Le polymorphisme se caractérise par l’insertion d’un nucléotide dans sa séquence, avec des conséquences sur l’activité biologique de la protéine. Or, celui-ci a un rôle antimicrobien par l’induction de cytokines telles que TNF α et IL-8, qui sont donc moins exprimées chez les individus portant l’allèle mutée codant FEZL.

L’apparition de la puce Ovine SNP50 a permis d’initier de nombreuses recherches dans la race Lacaune lait afin de déterminer le support génétique de la résistance aux mammites. Des analyses transcriptomiques ont permis d’identifier de nombreux gènes candidats pour la résistance aux mammites (Banos et al. 2017; Bonnefont et al. 2011). Parmi eux, on trouve des gènes impliqués dans les réponses inflammatoire et immunitaire, et certains même ayant déjà

été identifiés chez les bovins dans le même contexte, renforçant l'idée d'une communauté de mécanismes entre les espèces.

Plusieurs QTL relatifs aux CCS ont également été identifiés sur différents chromosomes, ce qui confirme l'architecture polygénique de ce caractère (Rupp et al. 2014). Un de ces QTL, situé sur le chromosome OAR3, est particulièrement significatif. Une étude menée par (Rupp et al. 2015) a permis d'affiner le génotype sous-jacent. Une mutation significativement associée à des CCS élevées a été identifiée : il s'agit de la substitution d'un C en T dans le gène codant la protéine SOCS-2 (Suppressor of Cytokine Signaling-2). Une modification de la structure tridimensionnelle de la protéine conduit à la perte de ses fonctions. Le génotype de *Socs2* explique 12% de la variabilité génétique du critère CCS, ce qui est une part relativement élevée du caractère. La présence de la mutation *Socs2* a été estimée à 21,7% au sein de la population Lacaune lait, certainement en relation avec le fait qu'elle est associée à un gain de production. En effet, au cours de cette même étude, (Rupp et al. 2015) ont noté que les animaux portant la mutation à l'état homozygote étaient plus lourds que les animaux de génotype C/C, avec une augmentation de 18% en moyenne du poids des brebis de génotype T/T, et des valeurs intermédiaires pour le génotype C/T. Cette différence est reliée à la longueur des os qui varie selon le génotype (on observe des os plus longs chez les brebis porteuses de la mutation à l'état homozygote).

La famille des protéines SOCS, à laquelle appartient SOCS-2, joue un rôle dans la régulation de l'hormone de croissance et de certaines cytokines. La baisse d'activité de SOCS-2 due à la mutation induirait donc une réponse inflammatoire incontrôlée, ce qui expliquerait les proportions élevées de leucocytes qui s'accumulent chroniquement dans la mamelle et que l'on retrouve dans le lait (Rupp et al. 2015). De même, le contrôle négatif de SOCS-2 sur les fonctions du récepteur à la GH (Growth Hormone), l'hormone de croissance, est altéré, ce qui affecte directement le développement de la glande mammaire et sa physiologie, pouvant expliquer l'augmentation de la production laitière. Cette conséquence pourrait justifier la corrélation négative apparente entre les caractères de production et les CCS.

Malgré ces observations, la présence d'autres SNP au sein de ce QTL sur le chromosome OAR3 n'est pas exclue. Une seconde étude a cherché à valider l'effet pléiotrope de la mutation du gène *Socs2* (Oget et al. 2018), c'est-à-dire son influence sur plusieurs caractères phénotypiques (CCS, poids, production laitière). En d'autres termes, il s'agissait de définir si

la région identifiée sur le chromosome OAR3 était représentée par un seul QTL ayant un effet pléiotrope ou si elle était composée de plusieurs QTL hautement liés.

Deux SNP ont été identifiés dans cette région :

- Le premier correspond à la mutation du gène *Socs2*, hautement associée aux CCS, au titre bactérien du lait (*Staphylococcus* spp), au poids et à la présence d'abcès
- Le second se situe sur le gène CRADD mais est beaucoup moins significatif et seulement lié aux CCS et au titre bactérien du lait.

L'effet pléiotrope de la mutation ponctuelle de SOCS-2 a donc été validé. En modifiant l'affinité de la protéine pour certains récepteurs, la régulation de différents signaux est perturbée, ce qui influe sur la réponse inflammatoire et le contrôle de l'infection. L'effet sur le poids est lui dû à l'action régulatrice directe de SOCS-2 sur l'hormone de croissance.

En revanche, aucun SNP de cette région n'est montré significativement associé à la production laitière. Cette observation sous-entend un effet indirect de la mutation avec des individus de plus grande taille.

Ce SNP n'a pas été retrouvé chez la race MTR, et il se pourrait que cette mutation ne soit apparue que dans la race Lacaune (Oget et al. 2019). Il existe en revanche 3 autres régions associées aux mammites qui impliqueraient des gènes communs aux différentes races ovines laitières.

Partie 2 : Etude expérimentale

La sélection génétique entre aujourd'hui dans le cadre de la lutte contre les mammites chez la brebis laitière. Les avancées technologiques ont permis de mieux caractériser le support génétique de la résistance aux mammites, notamment grâce à l'identification d'une mutation ponctuelle de la protéine SOC-2, à l'origine d'une perte de fonction biologique. Elle se traduit entre autres par une augmentation de la taille et du poids des animaux, mais elle est surtout associée à des CCS élevée et donc à une plus forte incidence de mammites. Les mécanismes sous-jacents de cette sensibilité sont encore méconnus.

L'objectif de ce travail est de rechercher des variations dans les réponses inflammatoires systémiques de deux groupes de brebis en fonction du génotype *Socs2*, face à une infection mammaire à *Staphylococcus aureus*. Pour cela, deux niveaux d'analyses seront étudiés pour comparer les deux groupes génétiques. Dans un premier temps, nous comparerons l'expression clinique de l'infection, en prenant comme critères les symptômes systémiques, liés notamment à un état fébrile. Puis nous comparerons les comptages leucocytaires et la mesure des concentrations cytokiniques sanguines entre les deux groupes, afin d'obtenir une analyse quantitative de certains acteurs de l'immunité.

I. Matériel et méthodes

I.1. Animaux

I.1.1. Ressources disponibles

Seize brebis de race Lacaune et issues du domaine INRA de La Fage ont été recrutées pour cet essai. Elles avaient été confirmées gravides 2 mois avant leur entrée dans l'unité expérimentale de proximité de l'UMR IHAP sur le campus de l'ENVT. La mise à la reproduction avait été maîtrisée à l'aide d'éponges vaginales pour assurer des agnelages groupés et un nombre de jours de lactation aussi homogène que possible au moment de l'inoculation.

L'effectif total est composé de deux sous-groupes de taille identique (8 brebis) qui diffèrent selon le variant allélique du gène *Socs2*. Toutes les brebis sont homozygotes à ce locus, à savoir : 8 brebis de génotype *Socs2* C/C (allèle sauvage) et 8 brebis de génotype *Socs2* T/T (allèle muté). Le génotypage des animaux a été réalisé à l'aide de la technique KASPar, qui utilise la compétition entre deux amorces spécifiques de chacun des allèles, révélée par une mesure de la fluorescence.

I.1.2. Critères d'inclusion

Toutes les brebis sont des agnelles primipares afin d'augmenter la probabilité que la mamelle soit saine au début de la lactation et au moment de l'inoculation. Elles ont été prioritairement choisies à cause de l'homozygotie du gène *Socs2*. Dans la mesure du possible, les brebis C/C et T/T ont été appariées sur la base de l'apparentement génétique. Pour cela, 7 béliers ont été utilisés, de génotype *Socs2* C/T pour 6 d'entre eux et T/T pour le dernier, au moment de la reproduction avec des mères de génotypes *Socs2* variables mais préalablement connus. Parmi les 16 brebis utilisées dans cette étude, quatre couples de brebis C/C et T/T sont nés de pères identiques. Ces couples de demi-sœurs par le père ont été formés en prévision de la prise en compte de l'apparentement au moment de l'analyse statistique des comparaisons entre les groupes génétiques, afin de réduire les effets dus à la variabilité génétique individuelle en dehors du gène *Socs2*.

D'autres critères ont été pris en compte comme le poids des brebis de façon à ce que l'écart soit le plus faible possible, malgré les effets de la mutation ponctuelle sur la croissance, la taille et le poids, et de manière à obtenir des lots de brebis avec des poids les plus proches possible au moment de l'inoculation. Enfin, les brebis ne portant qu'un seul agneau (13 brebis), ont été privilégiées pour faciliter la gestion des naissances et réduire au maximum les effets métaboliques négatifs liés à la gestation gémellaire.

Deux brebis sur les seize sélectionnées ont de plus été retirées de l'étude. L'une d'elle, de génotype T/T, a présenté une infection mammaire spontanée avant l'inoculation, mise en évidence par plusieurs analyses bactériologiques. Les données d'une brebis de génotype C/C n'ont pas été prises en compte pour respecter l'homogénéité des groupes, son choix étant basé sur sa mort précoce (7 jours post-inoculation).

I.2. Hébergement et alimentation

Les brebis ont été placées dans un parc commun au sein de l'une des bergeries de l'unité IHAP, sur une litière de paille accumulée, avec un apport quotidien pour garantir de bonnes conditions d'hygiène. Les animaux avaient accès à l'eau potable à volonté. La ration de base était constituée de foin de prairie permanente, distribué à volonté dans une mangeoire avec un accès à l'auge suffisant pour éviter tout risque de compétition. En outre, un plan de rationnement a été établi avec la distribution croissante d'un aliment concentré pour brebis laitière pour atteindre la quantité de 250 g d'aliment distribué deux fois par jour (matin et soir) au moment de l'épreuve infectieuse.

La salle de traite était attenante au parc où étaient hébergées les brebis, avec une aire d'attente et un quai de traite comprenant quatre places avec des attaches de type cornadis. Des portes ont été positionnées de manière à faire circuler les brebis de leur loge à l'aire d'attente, puis à la salle de traite par lot de quatre animaux avant qu'elles regagnent l'aire paillée. La présence de cornadis a permis la contention nécessaire au bon déroulement de la traite, des examens cliniques et des prélèvements sanguins.

I.3. Conduite

Pour la traite, une machine à traire mobile de la marque DeLaval a été utilisée. Elle comportait deux griffes dont chaque manchon était relié à une éprouvette, afin de pouvoir séparer et quantifier la production de lait de chaque hémimamelle. Deux bidons (un pour chaque griffe) récupéraient ensuite la totalité du lait de la traite. Un protocole de nettoyage de la machine avait été établi entre chaque traite avec une étape de rinçage, une étape de nettoyage à l'aide d'un détergent et une dernière étape de rinçage.

Les traites avaient lieu deux fois par jour à 08h et 16h, du 10/01/2018 au 04/02/2018. Au cours de chacune de ces traites, la production de chaque hémimamelle était relevée grâce au système d'éprouvettes graduées installé sur le circuit de traite. Le suivi de la production était donc individualisé à l'échelle de l'hémimamelle et a débuté 10 jours avant l'inoculation ; il s'est poursuivi tout au long de l'essai expérimental.

Pour éviter les contaminations croisées en cours d'expérimentation, un rinçage des manchons trayeurs était réalisé après chaque brebis présentant un lait modifié (présence de grumeaux ou changement de coloration du lait).

I.4. Protocole expérimental

I.4.1. Calendrier

Les animaux sont arrivés dans les locaux d'expérimentation le 12/12/2017, pour un début d'expérimentation prévu le 23/01/2018. Ce laps de temps a permis une adaptation aux nouvelles conditions d'hébergement et de rationnement. Les agnelages se sont déroulés du 28/12/2017 au 05/01/2018. Les agneaux sont restés avec leur mère pendant une semaine environ, avant d'être séparés et regroupés dans un parc adjacent. La traite exclusive avec la

machine à traire a débuté le 10/01/2017, afin d'habituer les brebis à la traite mécanique. La production individuelle a été enregistrée afin de constituer une référence de la production laitière environ une semaine avant l'inoculation.

Des analyses bactériologiques ont été réalisées à plusieurs reprises entre l'agnelage et l'inoculation afin de rechercher d'éventuelles infections spontanées. Ce suivi a été complété par la réalisation de CMT (le 05/01 et le 09/01), et d'un dénombrement cellulaire associé à une bactériologie sur gélose (le 11/01). Les résultats obtenus ont également permis le choix des hémimamelles à inoculer, qui étaient saines et n'avaient pas été préalablement infectées.

La phase expérimentale proprement dite a débuté le 23/01/2018 à 00h00 avec l'inoculation des brebis. Quatre brebis ont été euthanasiées et autopsiées avant la fin du suivi expérimental pour raison de bien-être animal et alors que leur production laitière avait beaucoup diminuée (une le 29/01, une le 30/01 et deux le 31/01/2018). Pour les autres animaux, le suivi a été réalisé jusqu'au 04/02/2018, où les brebis restantes ont été euthanasiées et autopsiées.

I.4.2. Inoculation

L'inoculation des brebis a eu lieu le 23 janvier 2018 à 0h00 et marque le début du temps expérimental. L'inoculum utilisé contenait un isolat de *Staphylococcus aureus* SA9A à la concentration de 10e3 UFC/mL. L'inoculation s'est déroulée dans des conditions d'aseptie, avec désinfection préalable de l'extrémité du trayon inoculé et le port de gants stériles par le manipulateur. Pour chaque brebis, 1 mL d'inoculum a été injecté par voie diathélique à l'aide d'une sonde stérile à usage unique dans l'hémi-mamelle préalablement retenue.

I.5. Examens cliniques

Le suivi des animaux a eu lieu toutes les 4h à partir de l'inoculation durant 48h (temps 0h, 4h, 8h, 12h, 16h et 20h), puis toutes les 12h jusqu'au 29/01 (temps 8h et 16h), soit à chaque traite. A chacune de ces dates d'examen, ont été réalisés les examens cliniques et les prélèvements de sang et de lait.

Pour les examens cliniques, des fiches type à compléter avaient été préparées pour cette étude (*Annexe 1 : Fiche d'examen clinique général* et *Annexe 2 : Fiche d'examen de la mamelle*). Elles prenaient en compte des critères observables ou mesurables sur l'état clinique de l'animal, susceptibles d'être modifiés lors de mammite clinique, tel que la température rectale, les fréquences respiratoires, cardiaque et ruminale, l'état d'hydratation, etc... La mamelle était

elle-aussi examinée sur différents points préalablement définis tels que les signes traduisant une inflammation, la présence d'abcès, ou encore l'aspect du lait.

Un système de score a été établi pour chacun de ces critères, compris entre une note égale à 0 lorsque le critère correspondait à celui d'un animal sain, et d'autant plus élevée que la réponse inflammatoire était forte (la note maximale étant de 2). Par exemple pour la température rectale, le score établi avait la valeur de :

- « 0 » pour une température comprise entre 38,5 et 39,5°C inclus (animal sain)
- « 1 » pour une température comprise entre 39,6 et 40°C inclus (début d'état fébrile)
- « 2 » pour une température >40°C (état fébrile marqué) ou <38,5

Pour certaines valeurs susceptibles de varier d'un individu à l'autre, les seuils ont été calculés à partir d'une valeur de base, définie de manière individuelle grâce aux données relevées avant l'inoculation. C'est notamment le cas pour la fréquence cardiaque, où la valeur de base correspond à la moyenne des trois valeurs relevées avant inoculation. Des scores généraux et mammaires sont générés par la somme des valeurs obtenues sur les critères d'évaluation de l'état clinique systémique et mammaire, respectivement. Le détail de tous les scores est présenté à l'*Annexe 3 : détail du calcul des scores généraux*.

Ces systèmes de notation étant relativement subjectifs, les examens cliniques ont été réalisés par deux personnes uniquement, avec comparaison fréquente des notes attribuées. D'autre part, afin d'affiner le suivi de la température, un thermobolus a été administré à chaque brebis le jour de leur arrivée dans l'unité expérimentale.

I.6. Traitement des échantillons

I.6.1. Nature des échantillons prélevés et conditionnement

➤ Echantillons sanguins

Les prélèvements de sang étaient réalisés à la veine jugulaire à l'aide d'un porte-tube et d'une aiguille à usage unique. Ils étaient réalisés après les examens cliniques, afin de ne pas fausser les résultats (notamment la fréquence cardiaque et la température rectale) et après la traite pour ne pas interférer avec son déroulement. Plusieurs tubes de sang (10 mL) ont été prélevés avec différents types d'anticoagulant (EDTA, héparine), et de la destination de l'échantillon. Plusieurs aliquotes de 100 µL étaient préparées à partir du tube EDTA :

- deux aliquotes pour la numération et la formule sanguines
- deux aliquotes pour le typage des monocytes et des lymphocytes en cytométrie de flux

- quatre aliquotes pour l'analyse du transcriptome

Tous ces spécimens étaient congelés à -80°C, de même que le reste du tube EDTA (5 mL minimum), après séparation du plasma, pour le dosage des métabolites, et le tube hépariné (5 mL au minimum) pour le dosage des cytokines.

➤ Echantillons de lait

Chaque prélèvement décrit ci-après a été réalisé pour chaque hémimamelle.

Un premier prélèvement aseptique (échantillon de 2 mL) pour la bactériologie était réalisé avant la traite, avec une désinfection préalable du trayon pour éviter une éventuelle contamination lors du prélèvement. A partir de celui-ci étaient réalisés trois aliquotes de 500 µL, conservées à 4°C pendant 24h maximum.

A la fin de la traite, 40 mL étaient collectés à partir des éprouvettes de la machine à traire. Sur cet échantillon :

- 10 mL était conservé à 4°C pour un traitement dans les 72h (CCS et différenciation de la composition cellulaire)
- 15 mL était centrifugé afin d'isoler le culot cellulaire et l'anneau graisseux après centrifugation. Cette phase liquide était congelée à -80°C, dans un tube de 5 mL et deux aliquotes de 500 µL, en prévision d'un dosage des composés solubles.

Enfin, un prélèvement supplémentaire de 40 mL fut réalisé à deux reprises au cours de l'expérimentation, pour un envoi dans un laboratoire extérieur d'analyse du lait (CIAL, Auch) et des analyses complémentaires comme les taux butyreux et protéique, et de comparaison des valeurs de concentration cellulaire avec celles acquises au laboratoire.

I.6.2. Analyses

➤ Analyses sanguines :

- Numération et formule sanguines : elles permettent d'identifier et de quantifier les différents types cellulaires dans le sang. Cette analyse est réalisée au laboratoire par la méthode de cytométrie en flux. Le typage fin des monocytes et des lymphocytes complète l'identification et la quantification plus précise des types cellulaires au sein de la lignée blanche. Cette analyse est également réalisée sur le site de l'ENVT à l'aide de

la cytométrie de flux, utilisant cette fois des marqueurs spécifiques de chaque type cellulaire. Trois grands types d'analyse ont été réalisés :

- Mesure de la concentration des différentes classes de leucocytes : leucocytes totaux, lymphocytes B, lymphocytes T, monocytes et granulocytes neutrophiles.
 - Mesure de la concentration des différents types de lymphocytes T : lymphocytes T totaux, T CD4 et T CD8.
 - Mesure de la concentration des cellules de la lignée myéloïde : leucocytes totaux, monocytes, et cellules NK
- Dosage fin des composés solubles : cela concerne notamment le dosage des cytokines, afin de caractériser le type de réponse induite par l'activation des cellules du système immunitaire. Ce dosage est réalisé à partir du plasma obtenu à partir du tube de sang prélevé sur héparine. Pour cela, une méthode multiplexe basée sur le principe Luminex a été utilisée. D'autres dosages comme ceux des protéines de l'inflammation, du cortisol, du β -hydroxybutyrate, etc... pourront être mises en œuvre au cas par cas à partir du plasma isolé à partir de l'échantillon de sang prélevé sur EDTA et conservé congelé, en fonction de leur pertinence compte tenu des premiers résultats obtenus.
- Transcriptome sanguin : il s'agit d'identifier et de quantifier les ARN messagers exprimés par les cellules sanguines. Cette analyse sera réalisée après une première analyse des résultats du suivi clinique et biologique, afin de choisir les dates les plus pertinentes à exploiter pour décrire les différences observées entre les deux groupes génétiques. Le séquençage est réalisé par la plateforme génomique GenoToul à partir des échantillons d'ARN extraits des échantillons de sang.
- Analyses du lait :
- Bactériologie : deux types d'analyses bactériologiques ont été effectuées avant et après l'inoculation. Comme décrit plus haut, une analyse bactériologique par la culture sur gélose est réalisée avant l'inoculation afin de déterminer le statut des hémimamelles et afin de retenir celles qui étaient saines, et écarter des hémimamelles/des brebis déjà infectées. Ensuite, pour suivre l'évolution de la charge bactérienne dans le lait après l'inoculation, une méthode de quantification de l'ADN bactérien par qPCR a été utilisée.

- Mesure de la concentration des cellules du lait : il s'agit d'une part du comptage des cellules somatiques du lait effectué avec un compteur DCC de la marque DeLaval. D'autre part, une différenciation des types cellulaires est effectuée grâce à une méthode de marquage des acides nucléiques des cellules vivantes permettant de distinguer les principaux types cellulaires présents dans le lait. Ces analyses sont réalisées au sein du laboratoire de l'UMR IHAP.
- Dosage des cytokines : test multiplexe développé par l'UMR IHAP pour la quantification des cytokines/chimiokines chez les ovins et les bovins
- Analyse de la composition du lait : permet de définir les taux protéique et butyreux avec une détermination fine du profil des acides gras. Elle a lieu au CIAL (Auch) à deux dates au cours du suivi.

I.6.3. Autopsies

L'euthanasie a été réalisée par injection intraveineuse de la dose recommandée de pentobarbital (Dolethal®) à la veine jugulaire. Des autopsies ont été systématiquement pratiquées sur toutes les brebis à la suite de leur euthanasie. L'aspect macroscopique du parenchyme mammaire a été enregistré et des prélèvements de tissus ont été conservés en vue d'une analyse histologique.

Le poids de la carcasse a été relevé, de même que le poids de certains organes : le foie, le cœur, les reins, la rate et les poumons. Enfin, les os longs des membres (humérus, radius, fémur et tibia) ont été mesurés dans leur plus grande longueur après retrait des muscles.

I.7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad. Les tests utilisés sont l'ANOVA majoritairement, les tests de Student, Mann Whitney et Wilcoxon. Les écarts sont considérés significatifs à partir d'une p-value $\leq 0,05$. La notation des différences significatives se présente comme tel :

- * pour une p-value $\leq 0,05$
- ** pour une p-value $\leq 0,01$
- *** pour une p-value $\leq 0,001$

Certaines valeurs ont subi une transformation logarithmique de manière à obtenir des valeurs dont la distribution suit une loi normale, notamment pour les données relatives à la concentration des cytokines.

II. Résultats

Parmi l'ensemble des résultats obtenus, nous nous intéresserons principalement aux effets systémiques de l'infection. Les données concernant l'examen mammaire font l'objet d'une autre thèse.

II.1. Caractérisation des scores généraux

Il s'agit des scores établis à partir des examens cliniques généraux. Le détail de leur calcul est décrit en *Annexe 3*.

II.1.1. Evolution générale au cours de l'infection

Parmi les neuf critères relevés lors des examens cliniques généraux, le décubitus et la déshydratation n'ont pas été pris en compte, à cause d'un nombre insuffisant d'observations (5 valeurs positives pour 366 relevés pour le décubitus et aucune pour la déshydratation). L'évolution des scores pour les autres critères est détaillée à la Figure 17. Ils ont été calculés jusqu'au temps 152 hpi, qui correspond au dernier relevé effectué sur l'ensemble des brebis de l'expérimentation, c'est-à-dire avant que la première brebis meure ou soit euthanasiée. Les données des thermobolus n'ont pas été incluses dans le calcul des scores de température car les données de quatre d'entre eux sont incomplètes suite à un dysfonctionnement.

En ce qui concerne les critères d'examen des muqueuses, de la fréquence cardiaque et de la température, on observe deux vagues d'augmentation de leurs valeurs. Pour la fréquence cardiaque et la température, le premier pic se situe entre 16 et 32 heures après inoculation (hpi, heure post-inoculation), alors qu'il est légèrement décalé pour le critère relatif aux muqueuses, soit entre 28 et 40 hpi. Le deuxième pic est commun à ces trois critères et apparaît entre 80 et 128 hpi. Les critères d'appétit et d'abattement ne montrent qu'une seule augmentation à partir de 56 hpi, avec un pic entre 80 et 128 hpi qui correspond à la deuxième augmentation observée pour les critères précédemment décrits. Enfin, l'évolution des scores de la fréquence respiratoire et de la rumination semblent aléatoires avec une fluctuation forte des valeurs. Malgré cela, on

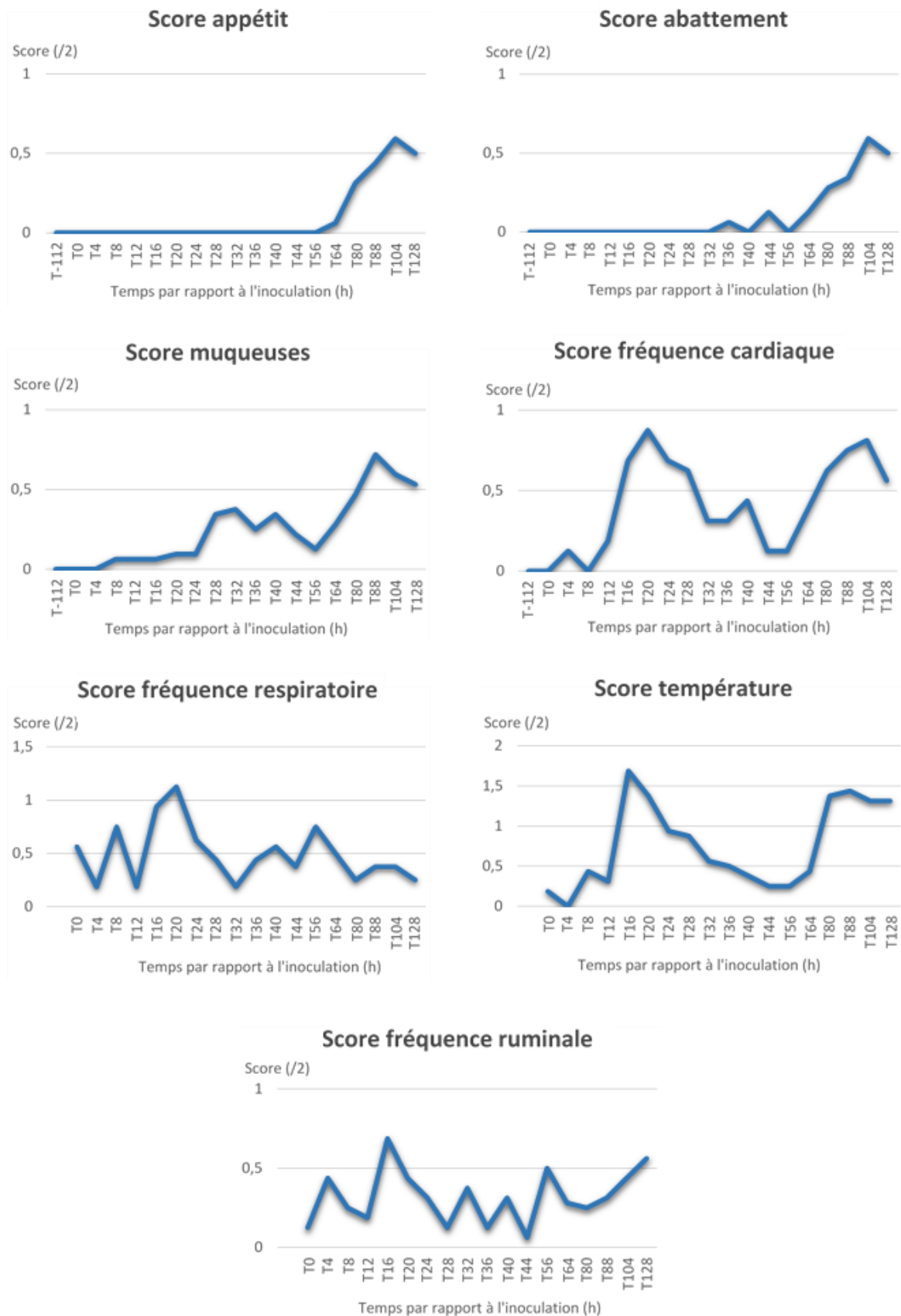


Figure 17 : Evolution des scores des différents critères de l'examen clinique général

observe que les valeurs les plus élevées ont lieu entre 16 et 20 hpi, ce qui correspond au premier pic d'augmentation de la fréquence cardiaque et de la température.

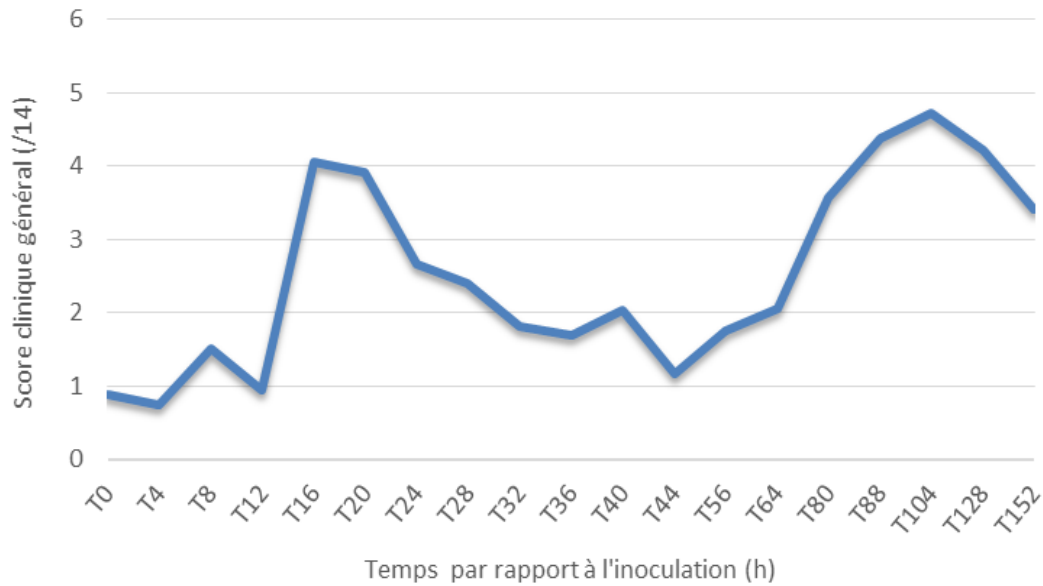


Figure 18 : Evolution du score général au cours de l'infection

Les valeurs des scores individuels évoluent de 0 à 13,5. Chez les quatre brebis ayant développé les signes les plus marqués, des scores supérieurs à 10 sont observés dans les jours

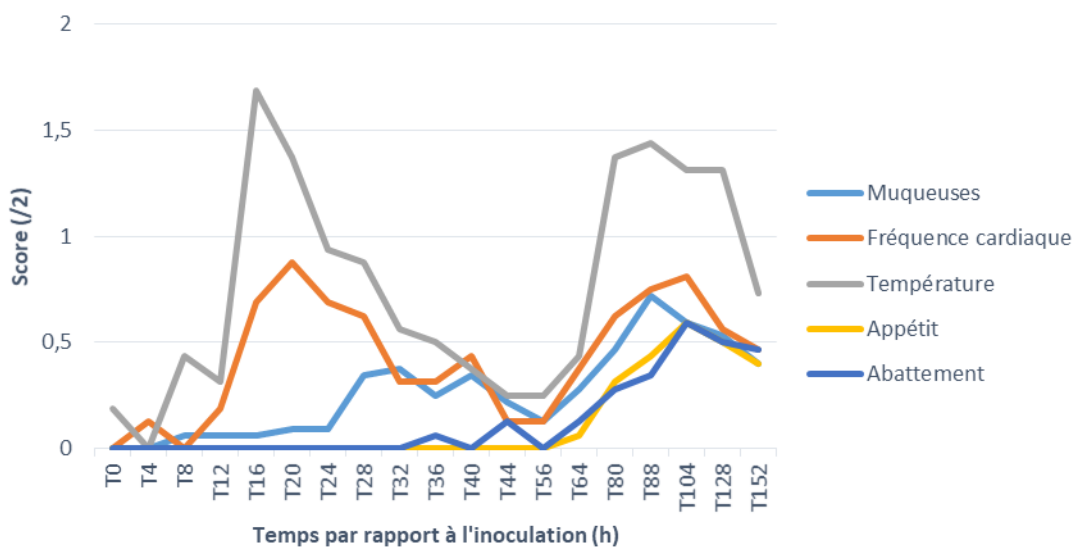


Figure 19 : Superposition des scores relatifs aux critères des muqueuses, de fréquence cardiaque, température, appétit et abattement

précédant leur mort ou euthanasie. Excepté une brebis de génotype T/T, les autres brebis n'ont pas montré de valeurs excédant 5,5.

L'évolution du score général montre deux principales phases d'augmentations des valeurs, correspondant à celles observées pour les différents critères qui le composent (Figure 17), soit de 16 à 32 hpi et de 80 à 128 hpi.

La Figure 19 présente la superposition des courbes des différents critères, en excluant les fréquences respiratoire et ruminale pour lesquelles l'évolution était aléatoire en dehors du premier pic, qui montre la concordance dans le temps de la variation des différents critères.

II.1.2. Evolution selon le génotype Socs2

La figure 20 montre l'évolution du score général en fonction du génotype C/C ou T/T.

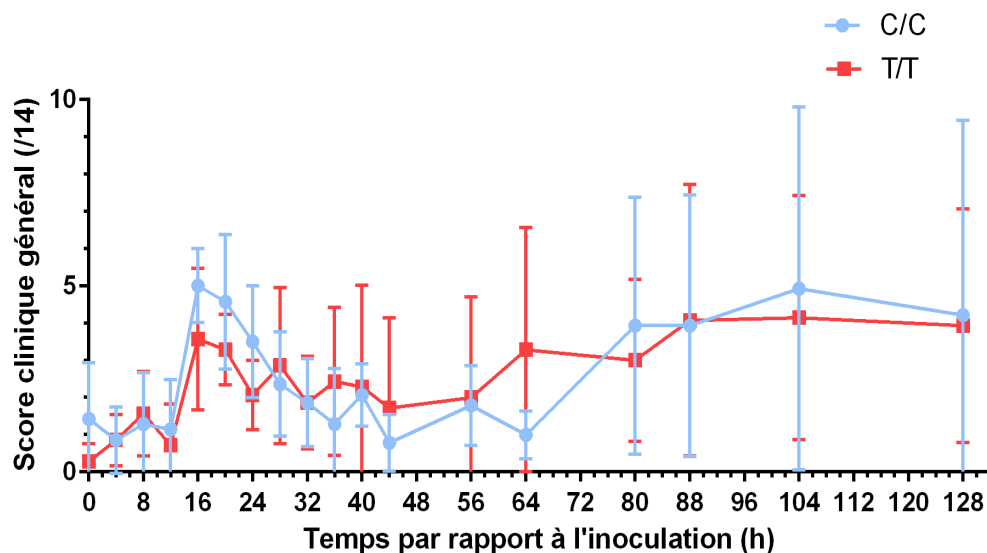


Figure 20 : Evolution du score général en fonction du génotype C/C ou T/T (Stat : 2way ANOVA : NS)

Lors du premier pic de 16 à 28 hpi, les valeurs des brebis de génotype C/C tendent à être supérieures à celles de génotype T/T, sans que la différence entre les deux groupes soit significative (2way ANOVA). Les autres valeurs ne montrent pas de différences significatives.

II.2. Caractérisation des profils cellulaires et cytokiniques sanguins

II.2.1. Evolution des profils cellulaires

Les analyses des profils cellulaires en fonction du génotype C/C ou T/T sont disponibles en *Annexe 5* (principaux lignages), *Annexe 6* (cellules T) et *Annexe 7* (cellules myéloïdes).

L'ensemble de ces profils cellulaires sanguins montrent une même évolution générale au cours de l'infection, quel que soit le génotype. Les cellules étudiées étant toutes des leucocytes, cette tendance générale est matérialisée par le profil des leucocytes totaux (Figure 21).

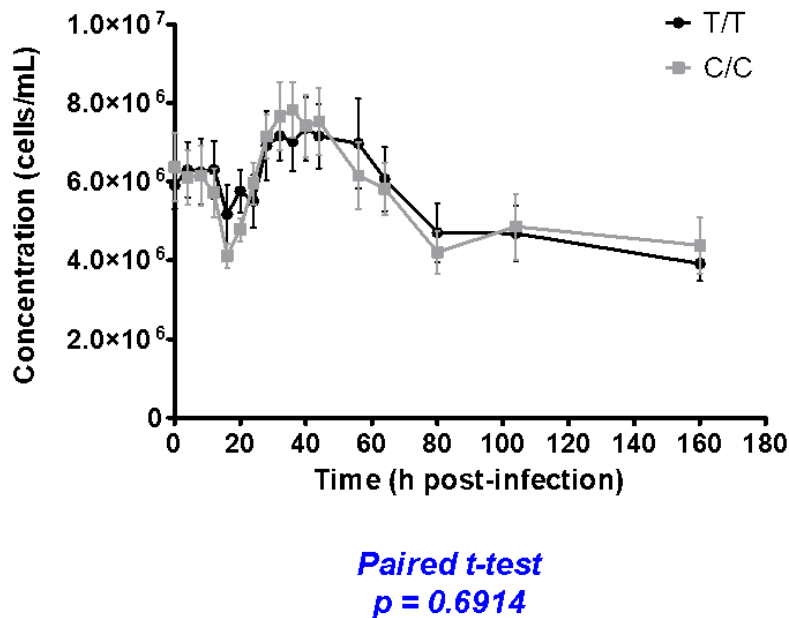


Figure 21 : Evolution des leucocytes sanguins au cours de l'infection pour chaque génotype

On observe au début de l'infection une diminution rapide de la concentration des leucocytes totaux, suivie d'une augmentation par la suite pour atteindre des valeurs supérieures aux valeurs initiales à T₀, qui correspondent aux valeurs physiologiques de cette espèce. La concentration diminue alors progressivement jusqu'aux valeurs basales ou légèrement en dessous à mesure que l'infection évolue. Ces trois étapes sont donc présentes dans tous les profils étudiés, mais peuvent advenir plus ou moins tôt au cours de l'infection et avec des amplitudes variables selon le type cellulaire concerné.

Ainsi, si l'on compare les différents profils sans tenir compte du génotype, la première diminution de la concentration cellulaire est plus précoce pour les granulocytes, les monocytes et les cellules NK par rapport aux lymphocytes (dès 8h post inoculation contre 16h), mais chez ces derniers, la baisse est la plus grande. L'augmentation qui s'en suit est faible et tardive pour les monocytes comparés aux autres types cellulaires, mais ceux-ci montrent une décroissance finale beaucoup plus marquée.

Plusieurs différences sont observées entre les brebis de génotype C/C et T/T. Certains de ces écarts de valeurs sont observables seulement pendant un intervalle de temps plus ou moins long au cours de l'expérimentation. C'est le cas pour les lymphocytes T, dont la concentration chute de manière plus marquée en début d'infection chez les animaux de génotype C/C, ou pour les lymphocytes B qui montrent une augmentation plus forte dans ce même groupe. Pour certains types cellulaires, les profils montrent un écart de valeur tout au long de l'infection, comme pour les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes T CD4- CD8- ou les différents ratios calculés. L'ensemble des types cellulaires ayant montré des profils significativement différents entre les deux génotypes sont rapportés dans le tableau 2

Tableau 3 : Types cellulaires dont les profils montrent des valeurs significativement plus élevées chez les individus de génotype C/C et T/T

	Génotype C/C	Génotype T/T
Fortement significatif	- Monocytes (CD14) - Lymphocytes B - Lymphocytes non B non T	- Lymphocytes T
Faiblement significatif	- Monocytes non classiques du sang - Ratio lymphocytes T CD4+/CD8+ - Lymphocytes CD11b+ CD16- - NK CD11b- CD16+	- Ratio PNN/monocytes - Lymphocytes T CD8+ - Lymphocytes T CD4- CD8-

Malgré un écart statistiquement non significatif, on observe chez les individus C/C une baisse des concentrations des granulocytes neutrophiles plus marquée à partir de 40h post-inoculation.

II.2.2. Evolution des profils cytokiniques

Le suivi de la production des cytokines s'est effectué à partir des prélèvements sanguins à 0, 8, 12, 16, 24, 56 et 104h post-inoculation. Les concentrations de 15 cytokines ont été mesurées, principalement des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , IL-8, TNF α , IL-17a), ayant pour certaines d'autres propriétés comme la modulation des différentes voies du système immunitaire (IFN γ , IL-2, IL-4) ou des propriétés anti-inflammatoires régulatrices (IL-10, IL-6). Des chimiokines, molécules attractives des leucocytes, ont également été dosées (CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4) ainsi que l'IL1Ra, antagoniste de l'IL1, capable de se fixer sur son récepteur et bloquant ainsi son action.

L'ensemble des profils relatifs à chacune de ces molécules et en fonction du génotype C/C et T/T sont disponibles en *Annexe 8 : Profils cytokiniques plasmatiques pour chaque génotype C/C et T/T*. La plupart d'entre elles sont présentes dans le sang de manière physiologique, excepté l'IL-6, ainsi que l'IL-17 et l'IFN γ présents en très faibles quantités. Les principales variations observées se produisent au début de l'infection, avant 12 hpi. De manière similaire aux profils leucocytaires, il s'agit généralement d'une diminution importante de leurs concentrations, rapidement corrigée, voire suivie d'une augmentation, notamment pour CCL2. Seules les trois cytokines présentes en très faibles quantités au moment de l'inoculation montrent une augmentation, observable à partir de 12 ou 16 hpi.

Trois molécules présentent des variations significativement différentes entre les individus de génotype C/C et ceux du génotype T/T. Il s'agit de l'IL-8, de CCL2 et de CCL3, qui sont présentés en Figure 22.

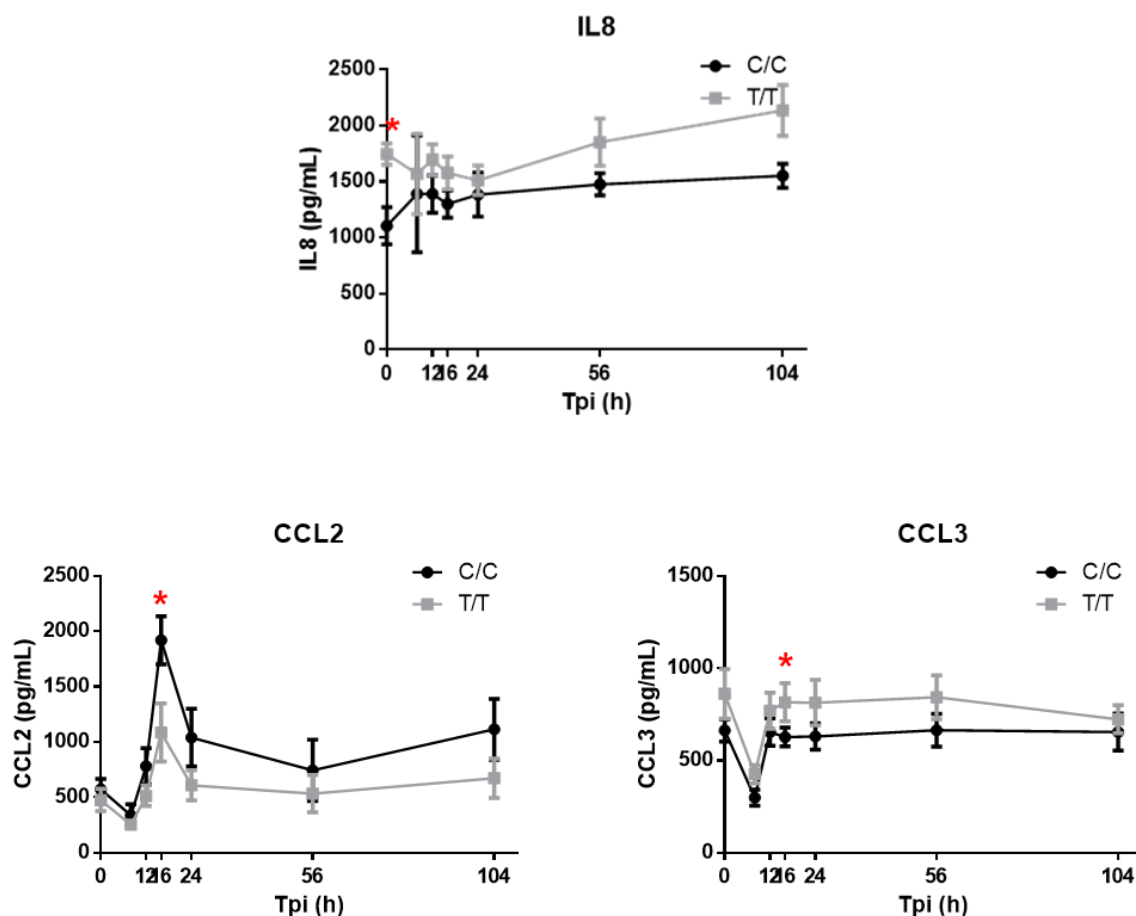


Figure 22 : Profils cytokiniques montrant des différences significatives entre les individus de génotype C/C et T/T

Les valeurs basales de l'IL-8 apparaissent plus élevées pour le groupe T/T. Les chimiokines CCL2 et CCL3 montrent elles des différences à 16hpi, et leurs concentrations sont plus élevées chez le groupe C/C et T/T, respectivement.

Les variations de la concentration d'IL-8 par rapport à sa valeur basale, soit sa valeur à T0, ont été estimées pour chaque groupe (Figure 23). Les concentrations sanguines en IL-8 augmentent à partir de 8 hpi, et cette amplification s'avère statistiquement plus forte à T56 pour le groupe C/C. D'autre part, alors que les concentrations en IL-8 semblent rester stables pour le groupe T/T, elles montrent une augmentation de 40% 12 hpi pour le groupe C/C, et se maintiennent durant le reste du suivi.

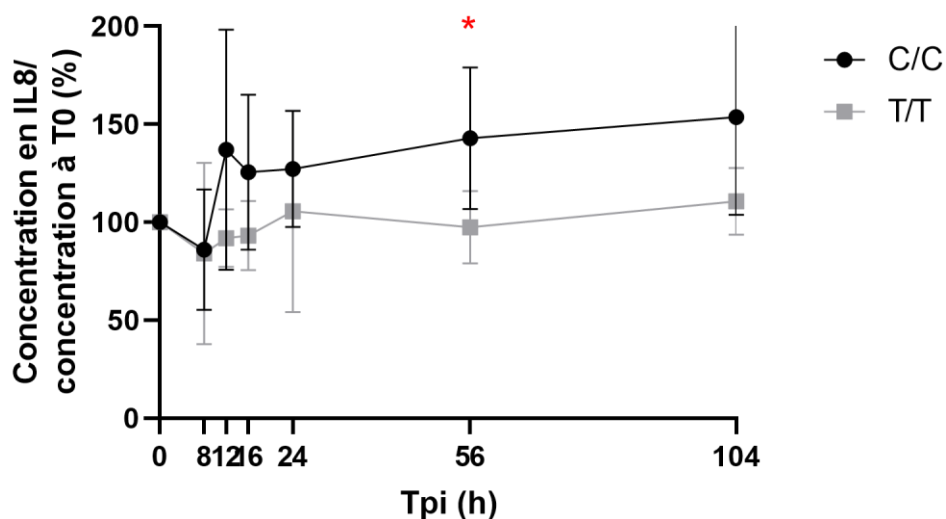


Figure 23 : Evolution de la concentration en IL8 par rapport à la concentration basale pour chaque génotype
 Test statistique : Mann-Withney test

II.3. Influence de *Socs2* sur les autres caractères

II.3.1. Evolution de la production laitière

Le suivi de la production laitière a débuté dès le passage à la traite exclusive, soit suite au retrait des agneaux une semaine après l'agnelage. Les productions journalières varient de

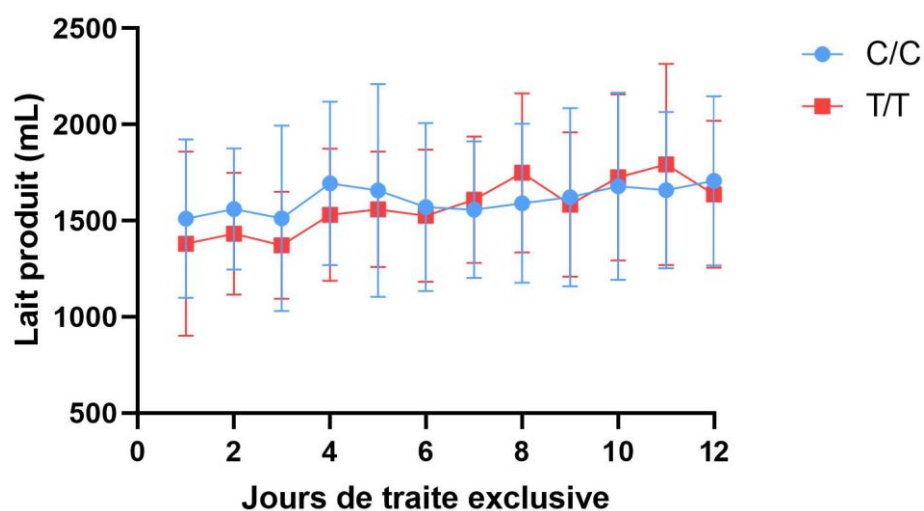


Figure 24 : Evolution de la production laitière avant inoculation selon le génotype *Socs2*
 Test statistique : 2way ANOVA

800 à 2600 mL selon les brebis, sans qu'une différence significative entre les deux groupes avant l'inoculation soit observée (Figure 24).

Pour évaluer la baisse de la production laitière au cours de l'infection, nous avons établi une production de référence individuelle, obtenue en calculant la moyenne de la quantité de lait produit au cours des 10 jours précédents l'inoculation, pour chaque brebis. La production est alors exprimée en pourcentage de cette production de référence (Figure 25). On observe une diminution franche de la production laitière par l'hémimamelle inoculée dès J2 post infection, alors que l'hémimamelle controlatérale montre une baisse plus légère à partir de J3 post infection. La production de chaque hémimamelle a alors été évaluée en fonction du génotype de *Socs2* (Figure 26). On retrouve la baisse précoce (J2) et prononcée de la production par l'hémimamelle inoculée, et celle plus discrète et plus tardive (J3 pour le groupe T/T et J4 pour le groupe C/C) par l'hémimamelle non inoculée. La différence observée entre les deux lignées n'est pas significative.

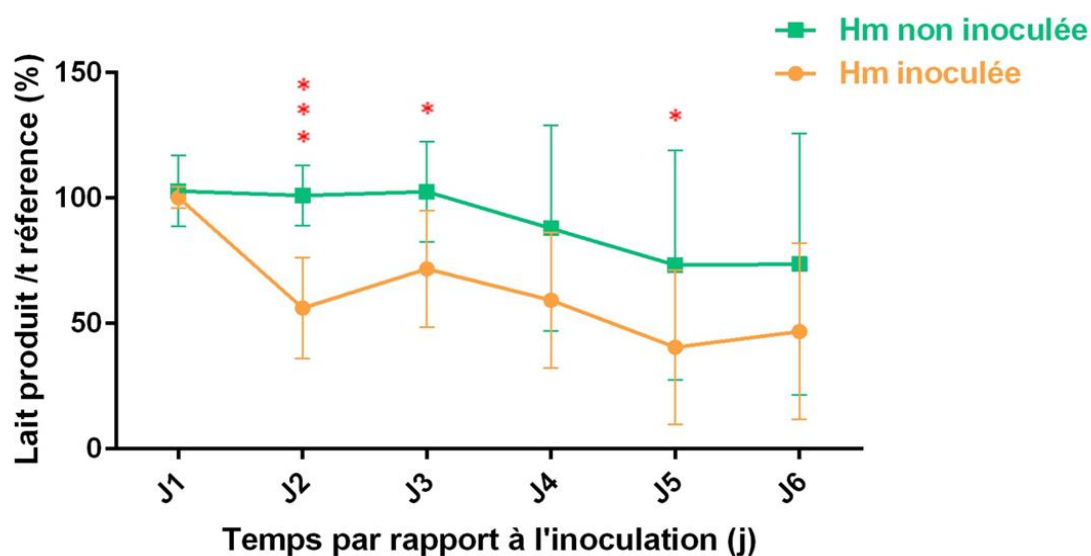


Figure 25 : Evolution de la production par hémimamelle en fonction du statut infectieux

Test statistique : 2way ANOVA

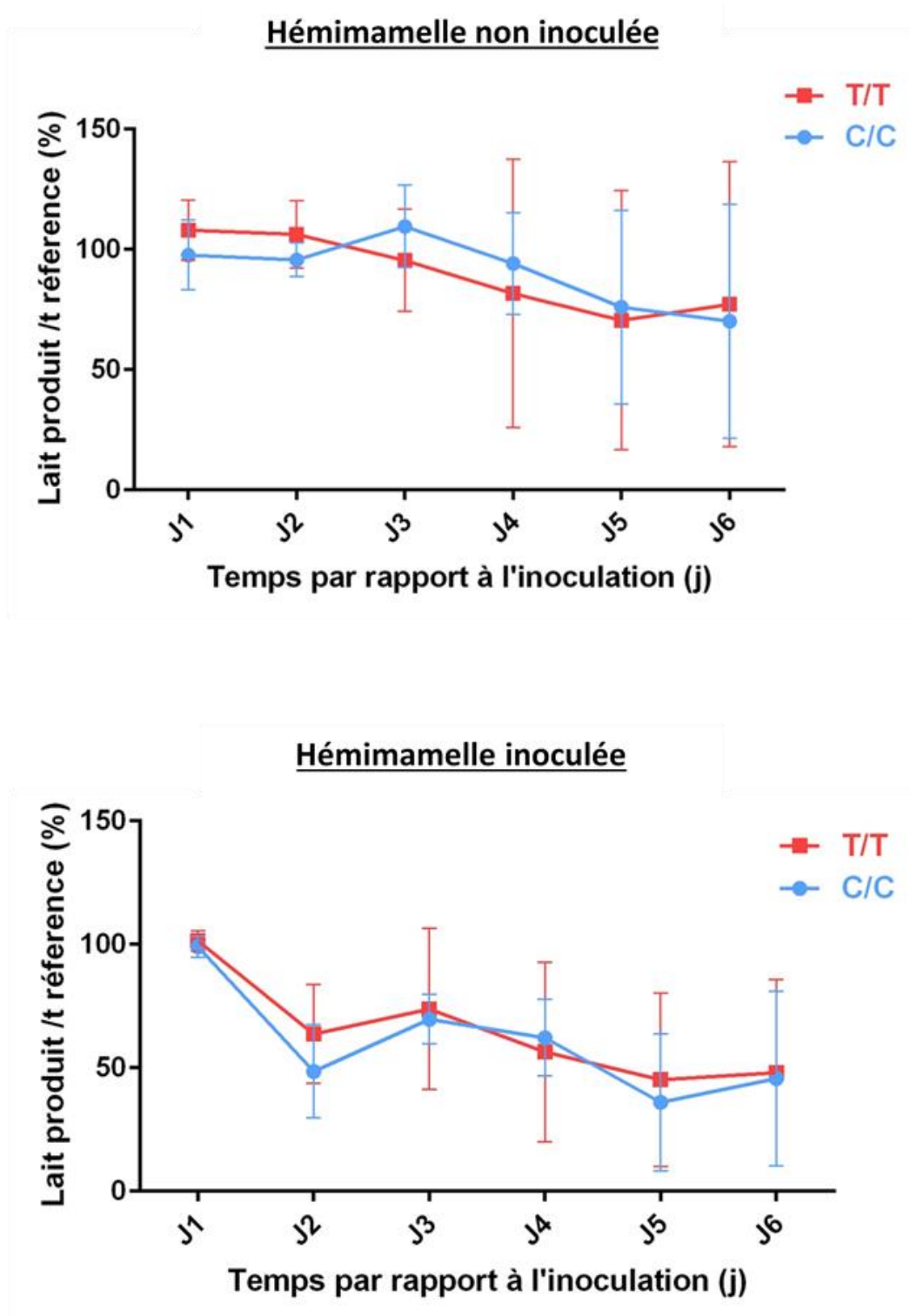


Figure 26 : Evolution de la production selon le génotype Socs2 pour l'hémimamelle inoculée et non inoculée

Test statistique : 2way ANOVA

II.3.2. Effet du génotype *Socs2* sur le poids et la croissance

Lors de l'autopsie, différentes mesures du poids et de la taille ont été effectuées. Le poids des brebis a été évalué avant et après la saignée et l'éviscération, afin d'obtenir un poids total et un poids de la carcasse (Figure 27). Les principaux organes, en dehors du tube digestif, ont eux aussi été pesés pour chaque brebis et comparés entre les deux groupes (Figure 27).

Aucune de ces pesées ne présente de différences significatives selon le génotype de *Socs2*.

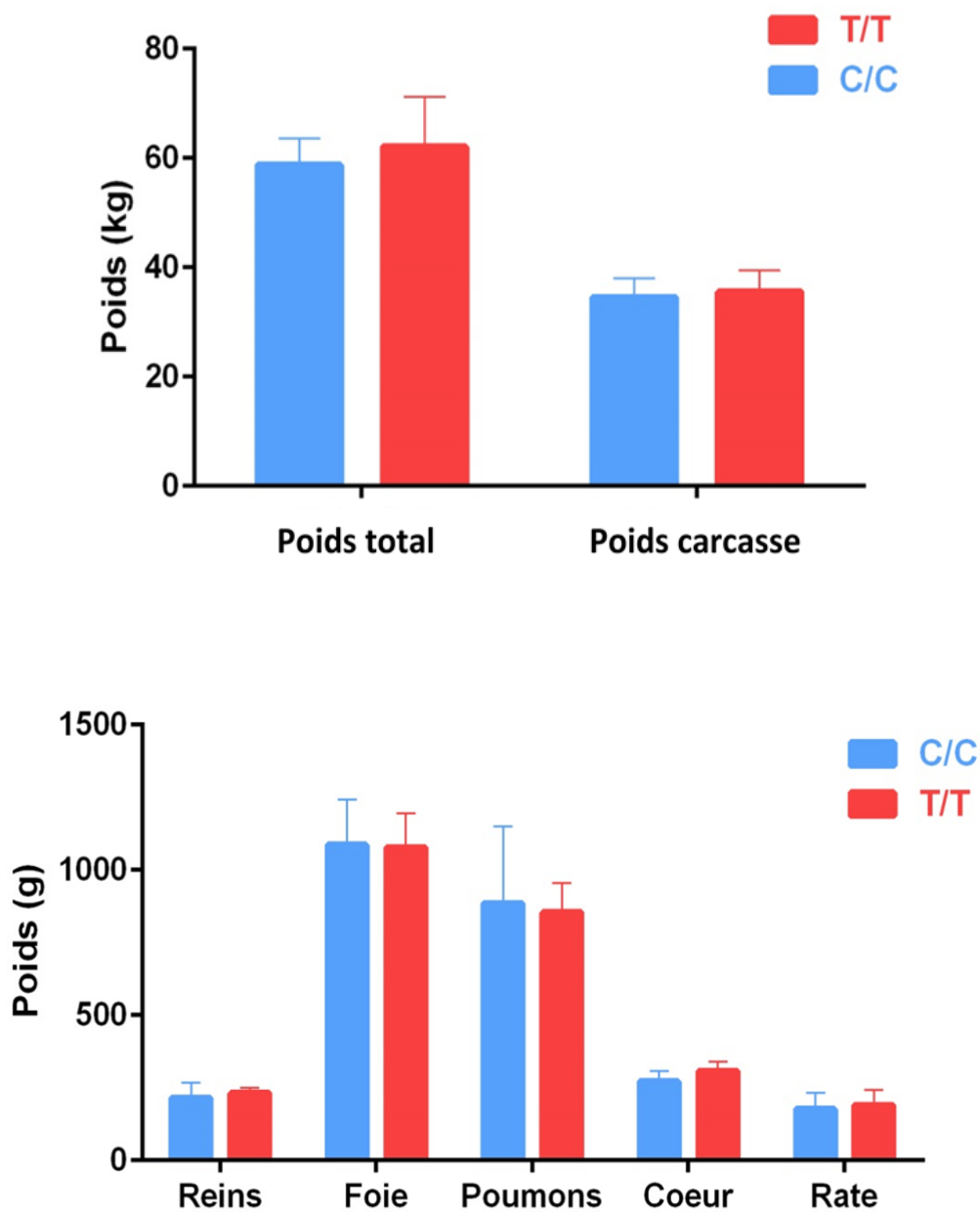


Figure 27 : Poids des brebis et de certains organes selon le génotype *Socs2*

Test statistique : 2way ANOVA

Enfin, la longueur des os longs a également été comparée entre les deux groupes (*Figure 28*). Des différences apparaissent pour les longueurs du fémur, du tibia et du radius, avec des longueurs plus élevées pour les animaux de génotype T/T.

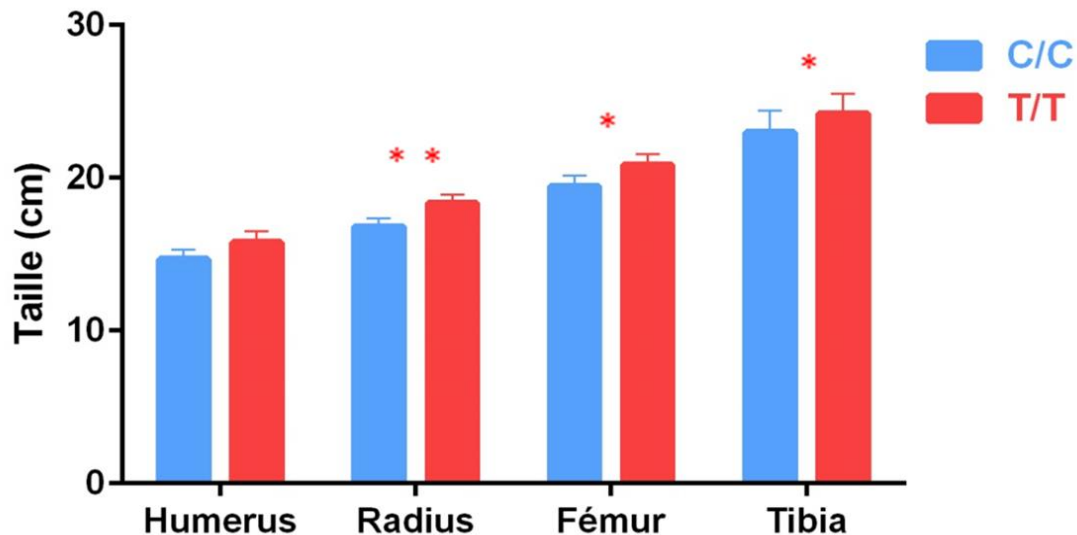


Figure 28 : Taille des os longs selon le génotype *Socs2*

Test statistique : 2way ANOVA

III. Discussion

L'objectif de cette étude était de mettre en évidence des variations des réponses inflammatoires systémiques dans deux groupes de brebis en fonction du génotype *Socs2*, face à une infection mammaire à *Staphylococcus aureus*. Des observations ont été effectuées à différentes échelles, d'abord d'un point de vue clinique, par les symptômes exprimés par les brebis, puis au niveau hématologique, par des mesures de la concentration cellulaire des différentes lignées leucocytaires et des dosages cytokiniques dans le plasma.

La mise en place concomitante d'une réaction inflammatoire et de mécanismes immunitaires a bien été observée ; ses constatations seront décrites d'abord d'un point de vue clinique (III.1), puis d'un point de vue hématologique (III.2). Certaines différences concernant les concentrations cellulaires et cytokiniques ont pu être mises en évidence entre les deux groupes et seront détaillées par la suite (III.2.1, III.2.2). La mise en commun de ces premiers résultats a permis d'émettre certaines hypothèses quant à l'altération des mécanismes de défense sous-jacente à la prédisposition apparente des brebis de génotype *Socs2* T/T face aux

mammites. Des perspectives de recherches ont alors été proposées afin de valider et d'approfondir nos observations (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

Enfin, cette étude nous a permis en parallèle, par le biais des autopsies, de valider l'effet pléiotrope de Socs2 sur la croissance des animaux, qui sera mentionné dans un dernier paragraphe (0).

III.1. Scores cliniques

Nous avons choisi de calculer des scores cliniques afin de pouvoir évaluer l'expression clinique des mammites et de suivre leur évolution dans le temps de façon synthétique. Ils ont été établis de manière à prendre en compte à la fois l'ensemble des symptômes observés et leur intensité.

Ainsi, les brebis ayant succombé à l'infection ou qui ont été euthanasiées précocement ont montré des scores supérieurs à 10, révélant la sévérité des conséquences de l'infection mammaire, possiblement associée à un choc septique. Par ailleurs, des scores faibles à modérés ont été obtenus pour les autres brebis, à l'exception d'une seule d'entre elles, indiquant que ce modèle d'infection mammaire à *Staphylococcus aureus* utilisant l'isolat SA9A provoque des mammites cliniques avec peu de signes généraux, ce qui était recherché pour la caractérisation et la comparaison des deux génotypes de brebis.

La cinétique d'évolution des scores au cours du temps est caractérisée par l'observation de deux pics, qui sont présents pour cinq des sept critères évalués. Cette dynamique de l'expression clinique a déjà été décrite à l'occasion de précédentes infections expérimentales à *Staphylococcus aureus* chez la brebis (Deverrière 2007). Le premier pic, correspondant à la phase aiguë de la mammite, apparaît dès 12 hpi ; il est consécutif à la rapide multiplication bactérienne qui suit l'inoculation. Le retour des scores à des valeurs proches de ceux obtenus avant l'inoculation indique une brève amélioration clinique, qui débute dès 24 hpi. La réponse immunitaire qui apparaît très rapidement après l'inoculation (cf Partie 2, II.2) montre donc une efficacité transitoire sur la colonisation bactérienne. La réapparition des symptômes généraux après trois à quatre jours post-inoculation sont le signe d'une reprise de la multiplication bactérienne, qui peut être à l'origine d'une bactériémie et d'un choc septique. Cela sous-entend que les défenses de l'hôte sont insuffisantes pour juguler l'infection dès les premiers jours.

Les deux groupes montrent des évolutions de scores similaires tout au long de l'infection. Malgré le fait que les courbes se détachent au niveau du premier pic, avec des valeurs plus élevées chez les brebis de génotype C/C, l'absence de différences statistiquement établies ne nous permet pas de conclure à un état inflammatoire aigu plus marqué dans ce groupe. Aucune différence de réaction face à l'infection n'est cliniquement visible sur le plan systémique entre les deux génotypes de Socs2.

Cependant, le score établi reste une notation relativement grossière de l'état clinique des animaux. En effet, l'échelle de score pour chaque critère ne permet pas d'être très précis dans l'intensité des symptômes. Si l'on prend l'exemple du critère de température, la note maximale de 2 est attribuée au même titre lorsque la température rectale est de 40°C ou de 41,9°C (valeur maximale relevée) ; l'amplitude de l'élévation de l'hyperthermie n'est donc pas prise en compte au-delà de 40°C. De plus, le score est peu adapté pour certains critères difficiles à apprécier sans analyseur. C'est par exemple le cas pour la déshydratation, qui a été évaluée selon l'intensité de l'énophtalmie. Or, ce signe n'apparaît que lorsque la déshydratation est déjà marquée et supérieure à 5%, ce qui n'a pas été le cas dans la présente étude. L'hématocrite aurait permis d'évaluer ce critère plus finement, mais cela aurait nécessité un examen complémentaire, qui dépasse le cadre de l'examen clinique.

Cela indique que, si des différences existent entre les deux groupes, elles sont d'intensité faible et ne peuvent pas être perçues par l'examen clinique, bien qu'il ait été répété à une fréquence élevée (toutes les 4 heures, puis toutes les 12h) au cours du suivi de la mammite.

III.2. Dosages sanguins

III.2.1. Profils cellulaires

Les courbes de l'évolution de la concentration des différents types cellulaires dans le sang montrent un profil qui rappelle celui de l'évolution clinique. Ainsi, la diminution de la concentration des leucocytes totaux qui apparaît peu de temps après l'inoculation (16 hpi) représente le recrutement des cellules de la circulation sanguine vers le site de l'infection. L'amplitude de cette baisse représente l'intensité de ce recrutement cellulaire. De ce fait, ce sont les lymphocytes qui montrent la plus forte variation dans le compartiment vasculaire au début de l'infection. On observe également la mobilisation des cellules immunitaires innées, avant celles du système immunitaire adaptatif, avec un recrutement des neutrophiles, des

monocytes et des cellules NK qui précèdent celui des lymphocytes. L'augmentation qui suit la phase initiale représente l'exportation de leucocytes depuis la moelle osseuse, consécutive à la mise en place des réactions immunitaires ; cela permet la migration d'un grand nombre de cellules effectrices, notamment des neutrophiles, dans le tissu mammaire dont une partie va se retrouver dans le lait et est responsable de l'augmentation des CCS. Cette production intense s'estompe au bout de quelques jours et les concentrations cellulaires reviennent dans l'intervalle des valeurs usuelles, à mesure que la réaction immunitaire diminue elle aussi. Cependant, alors que le recrutement au lieu de l'infection persiste, la production de cellules peut être insuffisante, ce qui entraîne une baisse de leur concentration en dessous des valeurs basales observées à T0. C'est le cas pour plusieurs des types cellulaires analysés, notamment les lymphocytes et les monocytes.

En ce qui concerne les différences de valeurs de concentrations cellulaires entre les deux groupes, on relève des différences au sein de deux grands types cellulaires : les monocytes et les lymphocytes.

Les monocytes totaux, identifiés par le marqueur de surface CD14, montrent une concentration légèrement supérieure chez les animaux de génotype C/C. En accord avec ces résultats, l'étude des profils cellulaires du lait (données non présentées qui font l'objet d'une autre étude) montre une augmentation de la concentration des monocytes qui tend à être supérieure dans le groupe C/C, mais cette différence n'est pas significative. Parmi les trois sous-populations de monocytes que l'on peut identifier, seuls les monocytes CD14^{low} CD16⁺ montrent des numérations différentes, et cette différence est présente tout au long de l'infection. Les monocytes CD14^{low} CD16⁺ sont à un stade de différenciation plus avancée que les CD14^{hi} et peuvent donner naissance à des cellules dendritiques possédant des capacités de présentation antigénique supérieure à celles issus des monocytes CD14⁺ CD16⁻. Ils produisent également une plus grande quantité de cytokines inflammatoires (Poupel 2013). Une étude chez la vache a démontré que la numération des monocytes CD14^{low} CD16⁺ sanguins relevés au cours des semaines précédant le vêlage, était positivement associée à un effet protecteur sur les maladies inflammatoires du post-partum, et notamment les mammites (Pomeroy et al. 2017). Cette sous-population de monocytes serait également la première à intervenir au cours de l'infection et à produire les médiateurs utiles à sa maîtrise.

Les concentrations des lymphocytes totaux sont similaires entre les deux groupes. En revanche, on observe des différences pour plusieurs catégories de lymphocytes. Chez les

animaux de génotype C/C, on observe une numération de lymphocytes B circulants plus élevée. Ces derniers sont les précurseurs des plasmocytes sécréteurs d'anticorps ; on peut donc faire l'hypothèse que la réponse humorale est différente entre les deux génotypes et que la production d'immunoglobulines pourrait être plus élevée dans ce groupe. Les lymphocytes négatifs pour les deux principales populations de lymphocytes T et B, (CD2 et CD21) sont également en nombre très significativement supérieur dans ce groupe, tout au long de l'infection. Il s'agit de lymphocytes ne portant ni le marqueur T (CD2) ni le marqueur B (CD21). L'identité de ce ou ces types cellulaires reste à déterminer, même si on peut supposer qu'il s'agit de cellules NK ou de cellules lymphoïdes innées (ILC). Ces lymphocytes n'appartenant ni à la classe T, ni à la classe B interviennent plutôt au cours de la réponse immunitaire innée. Afin de mieux les identifier, il aurait été intéressant d'utiliser le marqueur NKp46, qui constitue un marqueur spécifique de ces cellules, bien connu chez l'Homme et qui est maintenant un marqueur reconnu des cellules NK chez les ruminants (Storset et al. 2004; Sivori et al. 1997). Des anticorps dirigés spécifiquement contre NKp46 sont disponibles pour les analyses de cytométrie en flux, comme cela a été réalisé dans cette étude. Ces cellules s'activent très précocement lors de processus infectieux et inflammatoire et modulent la nature des réponses ultérieures. Ils montrent également une forte activité cytotoxique, qui pourrait être plus efficace chez les animaux de génotype C/C dont les concentrations sanguines des lymphocytes double-négatifs sont supérieures à celles du groupe T/T. Ils montrent de plus un recrutement précoce et une production par la moelle très supérieure. Cette hypothèse est confortée par des différences des valeurs de la concentration des cellules NK identifiées à l'aide des marqueurs CD11b^{neg} CD16⁺ entre les groupes ; les valeurs sont également supérieures dans ce groupe.

On observe chez les brebis de génotype T/T une numération lymphocytaire T très significativement supérieure à celle des animaux de génotype sauvage. Malgré cela, le recrutement précoce en début d'infection est d'intensité comparable dans les deux groupes. La production et la libération de cellules par la moelle osseuse semble même supérieure pour le groupe C/C puisque les valeurs des concentrations cellulaires apparaissent similaires au pic, alors qu'elles montraient un écart de près de 5×10^5 cell./mL au plus fort du recrutement initial. La mobilisation des lymphocytes T au cours de l'infection apparaît donc similaire dans les deux groupes malgré des concentrations sanguines initiales différentes. Cet écart peut être attribuable aux lymphocytes T CD8⁺ et T CD4⁻ CD8⁻ (n'exprimant ni le marqueur CD8, ni le marqueur CD4), pour lesquels une concentration basale significativement supérieure chez les animaux de génotype T/T est observée. La majorité des lymphocytes circulant double négatifs CD4⁻ CD8⁻

sont représentés par les lymphocytes $\gamma\delta$ (Lambert 2005). Ces derniers n'ont pas besoin de la présentation d'antigène pour être activés et peuvent reconnaître les agents pathogènes directement grâce à leur TCR. Ils possèdent une forte capacité cytotoxique, d'une manière comparable aux lymphocytes T CD8+. L'utilisation d'un anticorps spécifique de leur TCR aurait pu permettre d'identifier précisément cette classe de lymphocytes. Cependant, l'évolution des concentrations de ces deux sous-population au cours de l'infection est similaire entre les deux groupes. Il est alors difficile de conclure à un effet cytotoxique supérieur par les lymphocytes T CD8+ et T CD4-CD8- dans le groupe T/T.

Le ratio lymphocyte T CD4+/CD8+ a été identifié chez la vache comme étant inférieur chez les animaux prédisposés ou sensibles aux mammites (Park et al. 2004). Cette donnée pourrait être appliquée à la brebis puisque qu'il apparait supérieur pour le groupe C/C ; il pourrait aussi devenir un indicateur de résistance aux mammites dans cette race. Chez les individus de génotype T/T, c'est le rapport GNN/monocytes qui est supérieur tout au long de l'infection. Ce ratio est utilisé en médecine humaine comme indicateur pronostique de pathologies débilitantes telles que les cancers et un marqueur du statut inflammatoire systémique. En outre, un rapport GNN/monocytes faible avant traitement représente un facteur pronostique défavorable pour les patients atteints de tumeurs malignes (Nishijima et al. 2015). Dans notre étude, l'inflammation systémique provoquée par la mammite serait plus faible chez les brebis de génotype C/C. Cependant, la signification de ce ratio n'a pas encore été démontrée chez les ruminants, ni dans le contexte des infections mammaires.

L'analyse du transcriptome dépasse le cadre de ce travail. Cependant, il permettra d'obtenir des profils cellulaires plus précis, notamment en identifiant mieux la nature des cellules présentes dans les échantillons. Son interprétation pourra valider ou non les observations et les hypothèses faites à partir des résultats obtenus en cytométrie de flux.

III.2.2. Profils cytokiniques

De manière similaire aux leucocytes, on observe pour les cytokines une phase de production précoce, dès 8 hpi, correspondant à la mise en place de la réponse innée. S'en suit rapidement une production plus ou moins forte de cytokines par les cellules impliquées dans la réponse immunitaire, avec une expression maximale entre 16h et 24 hpi.

Les trois molécules pour lesquelles on obtient des concentrations significativement différentes entre les deux groupes sont impliquées dans l'attraction des leucocytes vers le site

d'infection. L'IL-8 est une cytokine pro-inflammatoire possédant un fort pouvoir chimio-attractant sur les GNN essentiellement. Elle augmente également leurs activités bactéricide et phagocytaire (Ezzat Alnakip et al. 2014). Selon nos résultats, l'IL-8 a des concentrations basales plus élevées pour le groupe T/T ce qui traduirait la présence d'une inflammation initiale, qui peut être expliquée par la présence de mammites dans les héli-mamelles contro-latérales. Cependant, sa production en début d'infection apparaît plus forte pour le groupe C/C (Figure 23). L'augmentation précoce de la concentration de l'IL-8 dans le lait a été démontrée lors d'infection mammaire expérimentale à *Staphylococcus epidermidis* chez la brebis (Winter et al. 2003). Celle-ci est observée dès 2 hpi. De plus, il a été démontré chez la vache que l'injection d'IL-8 dans les quartiers infectés naturellement par *Staphylococcus aureus* avait un effet curatif aux stades très précoces de l'infection (Takahashi et al. 2005). Il serait donc intéressant de connaître les concentrations cytokiniques dans le lait afin de voir si on observe également une augmentation précoce d'IL-8, et si celle-ci est plus marquée chez les animaux de génotype C/C. D'autre part, un polymorphisme sur le gène promoteur de l'IL-8 a récemment été identifié chez la vache (Meade et al. 2012). Des études ont montré qu'il existait un lien entre certains allèles de cette région et la résistance aux mammites basée sur les CCS (Renjin et al. 2014). Ce polymorphisme n'a pas encore été décrit chez la brebis, mais il pourrait devenir un nouveau marqueur de sensibilité aux mammites, s'il était vérifié.

CCL2 et CCL3 sont deux chimiokines impliquées dans le recrutement cellulaire. CCL3 est responsable du recrutement des cellules de la lignée monocyttaire et de certains lymphocytes, tandis que CCL2 permet le recrutement de l'ensemble des leucocytes mononucléés et des GNN. On observe 16 hpi des concentrations plus élevées de CCL2 chez les individus de génotype C/C, et réciproquement pour CCL3 chez les individus de génotype T/T. Ainsi, il est difficile de conclure à une capacité de recrutement cellulaire plus élevée pour l'un des deux groupes. Cependant, l'augmentation plus forte de CCL2 à 16 hpi par rapport à CCL3 fait suspecter une implication accrue de cette chimiokine dans la réponse immunitaire. L'éventail des cellules concernées est également plus large, même si cela ne justifie pas que son pouvoir chimioattractif soit plus fort.

III.2.3. SOCS-2 et mécanismes immunitaires

Ainsi, certains types cellulaires (monocytes CD14^{low} CD16+, lymphocytes B et cellules NK) ont montré des différences de concentrations en faveur d'un meilleur recrutement post-

infection chez les brebis de génotype C/C. Bien que d'autres types cellulaires et cytokines (Lymphocytes T CD8⁺ et CD4-CD8⁻ ; IL8) aient également montré des concentrations plus élevées à certains moments de l'infection chez les brebis de génotype T/T (génotype plus sensible), les variations de leurs concentrations sont restées équivalentes, voire d'amplitude plus marquée chez les brebis C/C. L'implication de ces types cellulaires et de ces cytokines dans la réponse immunitaire peut difficilement être considérée comme supérieure chez les brebis T/T.

De ce fait, la mise en commun de ces résultats est en faveur d'une réponse immunitaire aigue plus marquée face à l'infection mammaire chez les brebis de génotype C/C. Cette réactivité immunitaire est essentielle et conditionne l'issue de l'infection. En effet, il s'agit d'une balance entre les défenses de l'hôte et la virulence de l'agent infectieux ; les cellules immunitaires doivent donc migrer au site de l'infection en nombre suffisant avant que les bactéries n'aient le temps de coloniser profondément le tissu mammaire (Colditz 1985). Ce constat est d'autant plus vrai ici que les bactéries de l'espèce *Staphylococcus aureus* sont entre autres caractérisées par leurs capacités à coloniser les tissus et à y établir des infections chroniques (Azara, Longheu, et al. 2017). Des infections mammaires chroniques par ce germe sont ainsi observées lors d'altérations de la réponse immunitaire avec un recrutement faible et tardif des granulocytes neutrophiles (Lahouassa 2007).

Aucune différence significative n'est observée sur les concentrations des granulocytes neutrophiles, malgré, là encore, une amplitude de valeurs qui apparaît plus grande chez les brebis C/C. Pourtant, ces derniers représentent le type cellulaire majoritairement retrouvé dans le lait lors d'infection et jouent un rôle fondamental dans les défenses de la mamelle (Rainard 2003). Leur capacité de phagocytose est cependant réduite dans le lait comparé au sang, et leur efficacité va dépendre du germe en cause ; *Staphylococcus aureus*, utilisé dans cette étude, a notamment développé de multiples mécanismes d'échappement à la phagocytose. Le recrutement intense de granulocytes neutrophiles n'est donc pas suffisant en soi pour assurer une bonne défense mammaire, d'autant plus que ces cellules sont en partie responsables des altérations du tissu mammaire. Un bon état d'activation permis par les cytokines et chimiokines est donc nécessaire, de même que l'ensemble des acteurs impliqués dans les réponses inflammatoire et immunitaire, qui vont favoriser la phagocytose (notamment via l'opsonisation) et fournir d'autres moyens d'éliminer les bactéries. Ainsi, la simple prise en compte des concentrations de granulocytes neutrophiles n'est pas suffisante pour qualifier le caractère résistant ou sensible aux mammites d'un animal. Il est nécessaire de considérer les mécanismes sous-jacents qui vont moduler leur mobilisation et leur efficacité. De ce fait, certains types

cellulaires pouvant apparaître comme ayant un rôle mineur, du fait de leurs faibles proportions au sein des cellules somatiques du lait lors d'infection, sont en réalité indispensables aux défenses mammaires. Dans le cadre de notre étude, les lymphocytes B, produits en plus grande quantité chez les brebis C/C, sont des producteurs d'anticorps dont certains (isotype IgG2) ont un pouvoir d'opsonisation puissant et favorisent grandement la phagocytose de *Staphylococcus aureus* par les granulocytes neutrophiles (Watson 1987). D'autres anticorps vont eux limiter l'adhésion des bactéries en se fixant sur leurs récepteurs. Les cellules NK, montrant également des concentrations supérieures chez les brebis C/C, apportent une activité cytotoxique complémentaire et très précoce.

Les différences que nous observons restent tout de même réduites. En effet, nous nous sommes intéressés aux principaux leucocytes et à quelques cytokines majeures intervenant dans la réponse immunitaire, qui étaient les éléments les plus susceptibles d'apporter une différence notable pour la sensibilité de l'hôte. L'analyse se réduit donc à un nombre limité de facteurs et de plus, ne fournit qu'une information quantitative, ce qui ne révèle qu'une faible partie du fonctionnement de la réponse de l'organisme. L'étude du transcriptome, envisagé dans la continuité de cette étude, pourra fournir un plus grand nombre d'informations, d'une part en ciblant un panel beaucoup plus large de facteurs (ensemble des cytokines induites, protéines inflammatoires...) et en donnant un accès à l'activité cellulaire. Il permettrait donc de mettre en évidence des différences d'expression de certains gènes au sein des cellules sanguines entre les groupes, et de mieux comprendre les mécanismes qui en découlent. Les résultats obtenus lors de cette présente expérimentation pourraient également être vérifiés.

Le transcriptome des cellules somatiques du lait relatif à des lignées de brebis sélectionnées sur le critère des CCS a déjà fait l'objet d'une précédente étude. Celui-ci a été réalisé en condition d'infection expérimentale à *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* (Bonfont et al. 2011). Parmi les gènes surexprimés chez les brebis résistantes, figurent des gènes liés à l'activation, l'adhésion et la diapédèse des cellules, notamment les granulocytes neutrophiles sanguins. Apparaissent également des gènes impliqués dans le recrutement et l'activation des lymphocytes T, lymphocytes B, cellules NK et cellules présentatrices d'antigènes, en accord avec nos observations. Les conclusions de cette étude étaient en faveur d'un meilleur mouvement cellulaire vers le site de l'infection avec un renouvellement cellulaire plus intense, et une reconnaissance de l'agent pathogène facilitée chez les brebis résistantes.

D'autre part, l'étude des réactions systémiques ne fournit qu'une partie des informations nécessaires à la compréhension d'une résistance supérieure chez les brebis de génotype C/C. En effet, l'issue de l'infection dépend des mécanismes mis en place au sein de la mamelle, et les mesures sanguines, indépendamment des défenses locales, peuvent déjà donner des informations pertinentes. D'autres compartiments cellulaires restent à explorer pour obtenir une vision globale, comme notamment l'étude des cellules épithéliales et des macrophages, qui semblent jouer un rôle essentiel.

III.3. Effet pléiotrope de *Socs2*

La production laitière évolue de manière similaire avant l'inoculation pour les deux groupes. On n'observe donc pas d'influence du génotype de *Socs2* sur le caractère de production en début de lactation.

La baisse marquée et rapide de la production par l'hémimamelle inoculée reflète la nature aigüe de la mammite provoquée. Elle est attribuable aux pertes fonctionnelles engendrées par la multiplication bactérienne rapide et intense. Les modifications observées pour l'hémimamelle controlatérale peuvent s'expliquer par les effets de l'inflammation et des répercussions systémiques de cette dernière. Quelle que soit l'hémimamelle, le génotype de *Socs2* n'a montré aucune influence sur la réduction de la production laitière. Il aurait été cependant intéressant de suivre la production des brebis dont la lactation s'est poursuivie, afin de voir si la récupération fonctionnelle après guérison était différente entre les deux groupes.

D'autre part, les brebis avaient des poids vifs et des poids de la carcasse qui étaient très proches, en lien avec le choix sur le poids vif qui avait été fait en amont. L'objectif était de limiter le biais dû à un poids différent, notamment par ses effets sur le métabolisme basal ; l'effet du génotype *Socs2* sur le poids a ainsi été dissipé. Le poids des organes dont le cœur, poumons, reins, foie et rate étaient eux aussi similaires dans les deux groupes.

En revanche, les os longs des brebis de génotype T/T étaient significativement plus grands, malgré des poids similaires entre les deux groupes. L'effet de SOCS-2 sur le poids est donc certainement dû à un effet sur la croissance osseuse, bien visible à travers les mesures qui ont été réalisées.

Conclusion

L'objectif de ce travail était de mieux comprendre les mécanismes responsables de la moindre résistance aux mammites des brebis de génotype *Socs2* T/T. Deux niveaux d'analyses ont été effectués pour comparer les deux groupes génétiques.

L'expression clinique de l'infection a d'abord été étudiée en prenant comme critères les symptômes systémiques liés notamment à un état fébrile. Aucune différence sur la sévérité de l'expression clinique n'a été mise en évidence ; l'examen clinique n'est donc pas assez précis et les mécanismes recherchés sont probablement beaucoup plus fins.

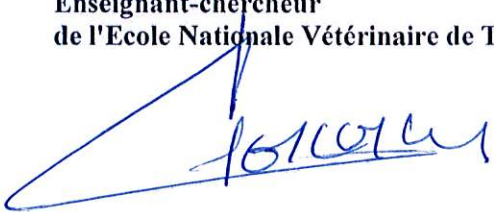
Les comptages leucocytaires et la mesure des concentrations cytokiniques sanguines ont ensuite permis une analyse quantitative de certains acteurs de l'immunité. Certaines différences ont été observées sur le recrutement et la production des lymphocytes B, cellules NK et monocytes CD14^{low} CD16+, laissant supposer une amélioration des systèmes de support à l'activité bactéricide des granulocytes neutrophiles. Cependant, la résistance aux mammites semble résulter d'interactions cellulaires complexes et minutieusement organisées, faisant intervenir de nombreux signaux de natures différentes. La compréhension détaillée des mécanismes inflammatoires et immunitaires à l'origine d'une meilleure résistance aux infections mammaires nécessite une vision plus précise et globale du fonctionnement cellulaire, en ciblant l'ensemble des compartiments impliqués dans les défenses mammaires.

AGREMENT SCIENTIFIQUE


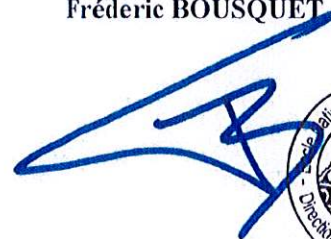
En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, Gilles FOUCRAS, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Charlotte DUHERON** intitulée « **Effet du gène SOCS-2 sur la réponse inflammatoire systémique lors de mammite à *Staphylococcus aureus*** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

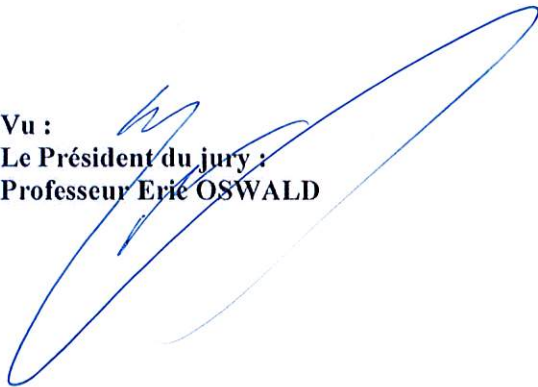
Fait à Toulouse, le 05/09/2019
Professeur Gilles FOUCRAS
Enseignant-chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
Le Directeur par intérim de l'Ecole
Nationale Vétérinaire de Toulouse
Frédéric BOUSQUET



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Eric OSWALD



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

Madame Régina André-Obrecht
Par délégation
Richard Guilet

Mme Charlotte DUHERON
a été admis(e) sur concours en : 2014
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 18/07/2018
a validé son année d'approfondissement le : 05/09/2019
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Bibliographie

ADDIS, Maria Filippa, PISANU, Salvatore, MAROGNA, Gavino, CUBEDDU, Tiziana, PAGNOZZI, Daniela, CACCIOTTO, Carla, CAMPESI, Franca, SCHIANCHI, Giuseppe, ROCCA, Stefano et UZZAU, Sergio, 2013. Production and release of antimicrobial and immune defense proteins by mammary epithelial cells following *Streptococcus uberis* infection of sheep. *Infection and Immunity*. 2013. Vol. 81.

ALBENZIO, M., SANTILLO, A., CAROPRESE, M., RUGGIERI, D., CILIBERTI, M. et SEVI, A., 2012. Immune competence of the mammary gland as affected by somatic cell and pathogenic bacteria in ewes with subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*. 1 juillet 2012. Vol. 95, n° 7, pp. 3877-3887.

ALEKISH, Myassar O., ISMAIL, Z. Bani, HAMMOURI, H. M., DARADKA, M. H., TAHA, S. Al et OLYMAT, I., 2018. Bacteriological cure rate and changes in milk composition in mastitis vaccinated ewes affected with subclinical mastitis. *Veterinary World*. février 2018. Vol. 11, n° 2, pp. 125-129.

AŞTI, R. N., KURTDEDE, N., ALTUNAY, H., ALABAY, B., ÖZEN, A. et BAYRAKTAROĞLU, A. G., 2011. Histological and immunohistochemical studies on the Furstenberg's Rosette in cows. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas, Kars (Turkey)*. 2011.

ASTRUC, Jean-Michel, BALOCHE, G, BUISSON, D, LABATUT, J, LAGRIFFOUL, G, LARROQUE, H et ROBERT-GRANIÉ, C, 2016. La sélection génomique des ovins laitiers en France. *Inra Productions Animales*. 2016. Vol. 29, n° 1, pp. 1-72.

AZARA, Elisa, LONGHEU, Carla, SANNA, Giovanna Maria et TOLA, Sebastiana, 2017. Biofilm formation and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* isolates collected from ovine mastitis. *Journal of applied microbiology*. 2017. Vol. 123, n° 2, pp. 372-379.

AZARA, Elisa, PIRAS, Maria Giovanna, PARISI, Antonio et TOLA, Sebastiana, 2017. Antimicrobial susceptibility and genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates collected between 1986 and 2015 from ovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. juin 2017. Vol. 205, pp. 53-56.

BANOS, G., BRAMIS, G., BUSH, S. J., CLARK, E. L., MCCULLOCH, M. E.B., SMITH, J., SCHULZE, G., ARSENOS, G., HUME, D. A. et PSIFIDI, A., 2017. The genomic architecture of mastitis resistance in dairy sheep. *BMC Genomics*. décembre 2017. Vol. 18, n° 1.

BARILLET, Francis, LAGRIFFOUL, Gilles, MARNET, P.-G, LARROQUE, H, RUPP, Rachel, PORTES, D, BOCQUIER, F et ASTRUC, Jean-Michel, 2016. Objectifs de sélection et stratégie raisonnée. *Inra Productions Animales*. 2016. Vol. 29, n° 1, pp. 19-40.

BARILLET, Francis, RUPP, Rachel, MIGNON-GRASTEAU, S, ASTRUC, Jean-Michel et JACQUIN, M, 2001. Genetic analysis for mastitis resistance and milk somatic cell score in French Lacaune dairy sheep. . 2001.

BAULEZ, Benjamin, 2006. *Etiologie des mammites cliniques des ovins laitiers dans le bassin de Roquefort*. Thèse vétérinaire. INP Toulouse.

- BERGONIER, D., BERTHELOT, X. et POUMARAT, F., 1997. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *International Office of Epizootics*. décembre 1997. Vol. 16, n° 3, pp. 848-873.
- BERGONIER, D et BERTHELOT, X, 2003. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science*. 1 janvier 2003. Vol. 79, n° 1, pp. 1-16.
- BERGONIER, D, BLANC, M C, FLEURY, B, LAGRIFFOUL, G, BARILLET, F et BERTHELOT, X, 1997. Les mammites des ovins et des caprins laitiers : Cytologie, épidémiologie, contrôle. In : *Rencontres autour des recherches sur les ruminants*. 1997.
- BERGONIER, Dominique, DE CRÉMOUX, Renée, RUPP, Rachel, LAGRIFFOUL, Gilles et BERTHELOT, Xavier, 2003. Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research*. 2003. Vol. 34, n° 5, pp. 689-716.
- BERTHELOT, X., LAGRIFFOUL, G., CONCORDET, D., BARILLET, F. et BERGONIER, D., 2006. Physiological and pathological thresholds of somatic cell counts in ewe milk. *Small Ruminant Research*. 1 mars 2006. Vol. 62, n° 1, pp. 27-31.
- BOICHARD, Didier, LE ROY, P, LEVÉZIEL, H et ELSÉN, J.-M, 2011. Utilisation des marqueurs moléculaires en génétique animale. *Inra Productions Animales*. 2011. Vol. 11, n° 1, pp. 67-80.
- BOICHARD, Didier, 2014. Quel futur pour l'amélioration génétique chez les espèces domestiques ? *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*. 2014. N° 1-3, pp. 103.
- BONNEFONT, Cécile MD, TOUFEER, Mehdi, CAUBET, Cécile, FOULON, Eliane, TASCA, Christian, AUREL, Marie-Rose, BERGONIER, Dominique, BOULLIER, Séverine, ROBERT-GRANIÉ, Christèle, FOUCRAS, Gilles et RUPP, Rachel, 2011. Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics*. décembre 2011. Vol. 12, n° 1.
- BONNEFONT, Cécile, 2011. *Analyses génomiques fonctionnelles de la résistance aux mammites : études de deux lignées divergentes de brebis sélectionnées sur la concentration cellulaire du lait*. Thèse vétérinaire. INP Toulouse.
- BRAMIS, Georgios, GELASAKIS, A. I., KIOSSIS, Evaggelos, BANOS, G. et ARSENIOS, George, 2018. Predisposing factors and control of bacterial mastitis in dairy ewes. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 2018.
- BRUGÈRE-PICOUX, Jeanne, 2016. Mammites. In : *Maladies du mouton - 3ème édition*. Edition France Agricole. pp. 271-279.
- BUISSON, Diane, ASTRUC, Jean-Michel et BARILLET, Francis, 2018. Bilan et perspectives de la gestion de la variabilité génétique des ovins laitiers en France. *INRA Productions Animales*. 11 juin 2018. Vol. 31, n° 1, pp. 1-12.
- BURRIEL, A. R., 1997. Dynamics of intramammary infection in the sheep caused by coagulase-negative staphylococci and its influence on udder tissue and milk composition. *The Veterinary Record*. 19 avril 1997. Vol. 140, n° 16, pp. 419-423.

BUSWELL, J. F. et BARBER, D. M. L., 1989. Antibiotic persistence and tolerance in the lactating sheep following a course of intramammary therapy. *British Veterinary Journal*. 1989. Vol. 145, n° 6, pp. 552-557.

CENITI, Carlotta, BRITTI, Domenico, SANTORO, Adriano Michele Luigi, MUSARELLA, Rosanna, CIAMBRONE, Lucia, CASALINUOVO, Francesco et COSTANZO, Nicola, 2017. Phenotypic Antimicrobial Resistance Profile of Isolates Causing Clinical Mastitis in Dairy Animals. *Italian Journal of Food Safety*. 3 mai 2017. Vol. 6, n° 2.

COLDITZ, Ian G. et WATSON, D-L, 1985. The immunophysiological basis for vaccinating ruminants against mastitis. . 1985.

CONTRERAS, A. Varas, SIERRA, Duque, SÁNCHEZ, Antonio, CORRALES, Julio César, MARCO, J. Morales, PAAPE, Max et GONZALO, Clemente, 2005. Mastitis in small ruminants. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 2005.

COOPER, S., HUNTLEY, S.J., CRUMP, R., LOVATT, F. et GREEN, L.E., 2016. A cross-sectional study of 329 farms in England to identify risk factors for ovine clinical mastitis. *Preventive Veterinary Medicine*. 2016. Vol. 125.

DE CREMOUX, Renee, LAGRIFFOUL, Gilles, ALLAIN, Charlotte, ALLAOUI-SOSSÉ, Laurence, ASTRUC, Jean-Michel, BATUT, Elodie, BERGONIER, Dominique, BRUN-LAFLEUR, Laure, CLÉMENT, Valérie, COUZY, Christèle, FOUCRAS, Gilles, FOUILLOUX, Marie-Noëlle, FRAPPAT, Brigitte, HUAU, Christophe, LECOMTE, Christophe, LEGRIS, Maxime, LEFRILEUX, yves, LOPEZ, C, MARNET, Pierre et RUPP, Rachel, 2018. MAMOVICAP -Vers des outils innovants d'intervention et d'aide à la décision pour la maîtrise des mammites en élevage de petits ruminants laitiers. . 1 janvier 2018.

DEVERRIÈRE, Béatrice, 2007. *Reproduction expérimentale de mammites à Staphylococcus aureus chez la brebis : comparaison de lignées génétiques divergentes pour les comptages cellulaires* [en ligne]. other. Disponible à l'adresse : <http://oatao.univ-toulouse.fr/1741/>

EZZAT ALNAKIP, Mohamed, QUINTELA-BALUJA, Marcos, BÖHME, Karola, FERNÁNDEZ-NO, Inmaculada, CAAMAÑO-ANTELO, Sonia, CALO-MATA, Pillar et BARROS-VELÁZQUEZ, Jorge, 2014. The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *Journal of Veterinary Medicine*. 2014.

FRAGKOU, I. A., BOSCOS, C. M. et FTHENAKIS, G. C., 2013. Diagnosis of clinical or subclinical mastitis in ewes. *Small Ruminant Research*. 2013. Vol. 118, n° 1-3, pp. 86-92.

FTHENAKIS, G. C., 2000. Field evaluation of flunixin meglumine in the supportive treatment of ovine mastitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2000. Vol. 23, n° 6, pp. 405-407.

GELASAKIS, A. I., MAVROGIANNI, V. S., PETRIDIS, I. G., VASILEIOU, N. G. C. et FTHENAKIS, G. C., 2015. Mastitis in sheep – The last 10 years and the future of research. *Veterinary Microbiology*. 14 décembre 2015. Vol. 181, n° 1, pp. 136-146.

GIADINIS, N. D., PANOUSIS, N., PETRIDOU, E. J., SIARKOU, V. I., LAFI, S. Q., POURLIOTIS, K., HATZOPOULOU, E. et FTHENAKIS, G. C., 2011. Selenium, vitamin E

and vitamin A blood concentrations in dairy sheep flocks with increased or low clinical mastitis incidence. *Small Ruminant Research*. 1 février 2011. Vol. 95, n° 2, pp. 193-196.

GOMEZ-LUCIA, Esperanza, BARQUERO, Nuria et DOMENECH, Ana, 2018. Maedi-Visna virus: current perspectives. *Veterinary Medicine : Research and Reports*. 21 mai 2018. Vol. 9, pp. 11-21.

GONZALO, Carlos, TARDÁGUILA, J. Alfonso, FUENTE, L. Fernando De La et PRIMITIVO, Fermín San, 2004. Effects of selective and complete dry therapy on prevalence of intramammary infection and on milk yield in the subsequent lactation in dairy ewes. *Journal of Dairy Research*. février 2004. Vol. 71, n° 1, pp. 33-38.

GOURREAU, J. M., 1995. *Accidents et maladies du trayon*. France Agricole Editions.

GYLES, C-L, PRESCOTT, J-F, SONGER, J-G et THOEN, C-O, 2010. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals Fourth Edition*.

HADIMLI, Hasan Hüseyin, ERGANIŞ, Osman, KAV, Kursat, SAYIN, Zafer et UNIVERCITY, Selcuk, 2005. Evaluation of a combined vaccine against staphylococcal mastitis in ewes. *Veterinary Institute in Pulawy*. 2005.

INRA 30 Ans De Recherches La Fage, 1995. .

JUSSIAU, Roland, MONTMÉAS, Louis et PAPET, Alain, 2010. *Amélioration génétique des animaux d'élevage : bases scientifiques, sélection et croisements*. Educagri éditions.

KHAN, Anika, 2006. Basic facts of mastitis in dairy animals: A review. *Pakistan Veterinary Journal*. 1 octobre 2006. Vol. 26.

KIRK, J. H., GLENN, J. S. et MAAS, J. P., 1996. Mastitis in a flock of milking sheep. *Small Ruminant Research*. 1 septembre 1996. Vol. 22, n° 2, pp. 187-191.

KORDALIS, N. G., ARSENOPOULOS, K., VASILEIOU, N. G. C., MAVROGIANNI, V. S., LIANOU, D. T., PAPADOPOULOS, E. et FTHENAKIS, G. C., 2019. Field evidence for association between increased gastrointestinal nematode burden and subclinical mastitis in dairy sheep. *Veterinary Parasitology*. 1 janvier 2019. Vol. 265, pp. 56-62.

La révolution génomique animale, 2011. . Editions France Agricole.

LAGRIFFOUL, G, MORIN, E, ASTRUC, Jean-Michel, BOCQUIER, F, DE BOISSIEU, C, HASSOUN, P, MARNET, P.-G, POULET, J.-L et BARILLET, F, 2016. Panorama de la production de lait de brebis en France. *Inra Productions Animales*. 2016. Vol. 29, n° 1, pp. 7-18.

LAHOUASSA, H, MOUSSAY, E et RAINARD, P, 2007. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to Staphylococcus aureus and Escherichia coli. . 2007.

LAMBERT, Claude, 2005. Lymphocytes T non conventionnels circulants détectés par cytométrie en flux. . 14 décembre 2005.

MALINGUE, Pierre, 2006. *Caractérisation étiologique et clinique des mammites en élevage ovin laitier*. Thèse vétérinaire. INP Toulouse.

MAVROGIANNI, Vasia S., CRIPPS, Peter J., PAPAIOANNOU, Nikolaos, TAITZOGLU, Ioannis et FTHENAKIS, George C., 2006. Teat disorders predispose ewes to clinical mastitis after challenge with *Mannheimia haemolytica*. *Veterinary Research*. février 2006. Vol. 37, n° 1, pp. 89-105.

MAVROGIANNI, Vasia S., MENZIES, Paula I., FRAGKOU, Ilektra A. et FTHENAKIS, George C., 2011. Principles of mastitis treatment in sheep and goats. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. mars 2011. Vol. 27, n° 1, pp. 115-120.

MEADE, Kieran G., O’GORMAN, Grace M., NARCIANDI, Fernando, MACHUGH, David E. et O’FARRELLY, Cliona, 2012. Functional characterisation of bovine interleukin 8 promoter haplotypes in vitro. *Molecular Immunology*. 1 février 2012. Vol. 50, n° 1, pp. 108-116.

MOLES, Yannick, 2002. *Dépistage des mammites subcliniques chez la brebis laitière*. Thèse vétérinaire. INP Toulouse.

MOLINA, A, MOLINA, M. P, ALTHAUS, R. L et GALLEGO, L, 2003. Residue Persistence in Sheep Milk Following Antibiotic Therapy. *The Veterinary Journal*. 1 janvier 2003. Vol. 165, n° 1, pp. 84-89.

MØRK, Tormod, WAAGE, Steinar, TOLLERSRUD, Tore, KVITLÉ, Bjørg et SVILAND, Ståle, 2007. Clinical mastitis in ewes; bacteriology, epidemiology and clinical features. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 24 septembre 2007. Vol. 49, n° 1, pp. 23.

NICKERSON, SC et AKERS, RM, 2011. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press.

NISHIJIMA, Tomohiro F., MUSS, Hyman B., SHACHAR, Shlomit S., TAMURA, Kazuo et TAKAMATSU, Yasushi, 2015. Prognostic value of lymphocyte-to-monocyte ratio in patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treatment Reviews*. décembre 2015. Vol. 41, n° 10, pp. 971-978.

OGET, C, ALLAIN, C, PORTES, D, FOUCRAS, G, TOSSER-KLOPP, G et RUPP, R, 2018. Fine mapping of 7 QTL regions in dairy sheep confirms pleiotropic effect of the R96C mutation in the *Socs2* gene on SCC, bacterial infection, size and milk production. . 2018. pp. 7.

OGET, Claire, ALLAIN, Charlotte, PORTES, David, FOUCRAS, Gilles, STELLA, Alessandra, ASTRUC, Jean-Michel, SARRY, Julien, TOSSER-KLOPP, Gwenola et RUPP, Rachel, 2019. A validation study of loci associated with mastitis resistance in two French dairy sheep breeds. *Genetics Selection Evolution*. 2019. Vol. 51.

OLIVES, Ana Martí De, DÍAZ, J. R., MOLINA, M. P. et PERIS, C., 2013. Quantification of milk yield and composition changes as affected by subclinical mastitis during the current lactation in sheep. *Journal of Dairy Science*. 1 décembre 2013. Vol. 96, n° 12, pp. 7698-7708.

PAAPE, M.J., POUTREL, Bernard, CONTRERAS, Antonio, MARCO, Juan C. et CAPUCO, A.V., 2001. Milk Somatic Cells and Lactation in Small Ruminants. *Journal of Dairy Science*. juin 2001. Vol. 84, pp. E237-E244.

PARK, Yong Ho, JOO, Yi Seok, PARK, Joo Youn, MOON, Jin San, KIM, So Hyun, KWON, Nam Hoon, AHN, Jong Sam, DAVIS, William C. et DAVIES, Christopher J., 2004. Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex

haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. *Journal of Veterinary Science*. mars 2004. Vol. 5, n° 1, pp. 29-39.

PENGOV, A. et KIRBIS, A., 2009. Risks of antibiotic residues in milk following intramammary and intramuscular treatments in dairy sheep. *Analytica Chimica Acta*. 1 avril 2009. Vol. 637, n° 1, pp. 13-17.

PÉREZ, M. M., PRENAFETA, A., VALLE, J., PENADÉS, J., ROTA, C., SOLANO, C., MARCO, J., GRILLÓ, M. J., LASA, I., IRACHE, J. M., MAIRA-LITRAN, T., JIMÉNEZ-BARBERO, J., COSTA, L., PIER, G. B., DE ANDRÉS, D. et AMORENA, B., 2009. Protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl beta-1,6 glucosamine specific antibody production using biofilm-embedded bacteria. *Vaccine*. 14 avril 2009. Vol. 27, n° 17, pp. 2379-2386.

PETRIDIS, Ioannis G. et FTHENAKIS, George C., 2014. Administration of antibiotics to ewes at the beginning of the dry-period. *The Journal of Dairy Research*. 2014. Vol. 81.

POMEROY, Brianna, SIPKA, Anja, HUSSEN, Jamal, EGER, Melanie, SCHUKKEN, Ynte et SCHUBERTH, Hans-Joachim, 2017. Counts of bovine monocyte subsets prior to calving are predictive for postpartum occurrence of mastitis and metritis. *Veterinary Research*. 21 2017. Vol. 48, n° 1, pp. 13.

POUPEL, Lucie, 2013. *Rôle des chimiokines dans la mobilisation monocyttaire au cours de l'athérosclérose*. Thèse de doctorat. Faculté de médecine Paris sud.

RAINARD, Pascal et RIOLLET, Céline, 2003. Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reproduction, Nutrition, Development*. 2003. Vol. 43, n° 5, pp. 439-457.

RAMOND, David, 2015. *Les mammites chez les petits ruminants : étude bibliographique*. Lyon : Université Claude-Bernard.

RENJIN, Chen, ZHENZHEN, Wang, ZHANGPING, Yang, XIAORONG, Zhu, DEJUN, Ji et YONGJIANG, Mao, 2014. Association of IL8 -105G/A with Mastitis Somatic Cell Score in Chinese Holstein Dairy Cows. *Animal Biotechnology*. 2014. Vol. 26, n° 2.

RUPP, R., BERGONIER, D., DION, S., HYGONENQ, M. C., AUREL, M. R., ROBERT-GRANIÉ, C. et FOUCRAS, G., 2009. Response to somatic cell count-based selection for mastitis resistance in a divergent selection experiment in sheep. *Journal of Dairy Science*. mars 2009. Vol. 92, n° 3, pp. 1203-1219.

RUPP, Rachel, PALHIÈRE, Isabelle, MAROTEAU, Cyrielle et BALOCHE, Guillaume, 2014. Mapping QTL controlling milk somatic cell counts in sheep and goat support the polygenic architecture of mastitis resistance. In : *10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production*. 2014.

RUPP, Rachel, SENIN, Pavel, SARRY, Julien, ALLAIN, Charlotte, TASCA, Christian, LIGAT, Laetitia, PORTES, David, WOLOSZYN, Florent, BOUCHEZ, Olivier, TABOURET, Guillaume, LEBASTARD, Mathieu, CAUBET, Cécile, FOUCRAS, Gilles et TOSSER-KLOPP, Gwenola, 2015. A Point Mutation in Suppressor of Cytokine Signalling 2 (Socs2) Increases the Susceptibility to Inflammation of the Mammary Gland while Associated with

Higher Body Weight and Size and Higher Milk Production in a Sheep Model. *PLOS Genetics*. 2015. Vol. 11, n° 12, pp. e1005629.

SIVORI, S., VITALE, M., MORELLI, L., SANSEVERINO, L., AUGUGLIARO, R., BOTTINO, C., MORETTA, L. et MORETTA, A., 1997. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *The Journal of Experimental Medicine*. 6 octobre 1997. Vol. 186, n° 7, pp. 1129-1136.

SORDILLO, L. M., SHAFER-WEAVER, K. et DEROSA, D., 1997. Immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science*. août 1997. Vol. 80, n° 8, pp. 1851-1865.

STORSET, Anne K., KULBERG, Siri, BERG, Ingvild, BOYSEN, Preben, HOPE, Jayne C. et DISSEN, Erik, 2004. NKp46 defines a subset of bovine leukocytes with natural killer cell characteristics. *European Journal of Immunology*. mars 2004. Vol. 34, n° 3, pp. 669-676.

SUGIMOTO, M., FUJIKAWA, A., WOMACK, J. E. et SUGIMOTO, Y., 2006. Evidence that bovine forebrain embryonic zinc finger-like gene influences immune response associated with mastitis resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 25 avril 2006. Vol. 103, n° 17, pp. 6454-6459.

TAKAHASHI, H., KOMATSU, T., HODATE, K., HORINO, R. et YOKOMIZO, Y., 2005. Effect of intramammary injection of RbIL-8 on milk levels of somatic cell count, chemiluminescence activity and shedding patterns of total bacteria and *S. aureus* in Holstein cows with naturally infected-subclinical mastitis. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. février 2005. Vol. 52, n° 1, pp. 32-37.

TARGOWSKI, S.P., 1983. Role of Immune Factors in Protection of Mammary Gland. *Journal of Dairy Science*. août 1983. Vol. 66, n° 8, pp. 1781-1789.

TOLLERSRUD, T., NØRSTEBØ, P.E., ENGVIK, J.P., ANDERSEN, S.R., REITAN, L.J. et LUND, A., 2002. Antibody Responses in Sheep Vaccinated against *Staphylococcus aureus* Mastitis: A Comparison of Two Experimental Vaccines Containing Different Adjuvants. *Veterinary Research Communications*. 2002. Vol. 26, n° 8, pp. 587-600.

TORRES-HERNANDEZ, Glafiro et HOHENBOKEN, William, 1980. Relationships between Ewe Milk Production and Composition and Preweaning Lamb Weight Gain. *Journal of Animal Science*. 1 avril 1980. Vol. 50, n° 4, pp. 597-603.

VASILEIOU, Natalia G.C., SARROU, Stela, PAPAGIANNITSIS, Costas, CHATZOPOULOS, Dimitris C., MALLI, Ergina, MAVROGIANNI, Vasia S., PETINAKI, Efi et FTHENAKIS, George C., 2019. Antimicrobial Agent Susceptibility and Typing of *Staphylococcal* Isolates from Subclinical Mastitis in Ewes. *Microbial Drug Resistance*. 22 avril 2019.

VILLARET, A. et MARKEY, L., 2011. *La génétique française pour les filières bovines, ovines et caprines*. 2011. France Génétique Elevage.

WATSON, D. L., 1987. Synergism between antibody and neutrophils in the ruminant mammary gland. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1987. Vol. 17, n° 1, pp. 389-400.

WINTER, Petra, SCHILCHER, Franz, FUCHS, Klemens et COLDITZ, Ian G., 2003. Dynamics of experimentally induced *Staphylococcus epidermidis* mastitis in East Friesian milk ewes. *The Journal of Dairy Research*. mai 2003. Vol. 70, n° 2, pp. 157-164.

ZECCONI, Alfonso, HAMANNO, Jörn, BRONZO, Valerio, MORONI, Paolo, GIOVANNINI, Giulia et PICCININI, Renata, 2002. Relationship Between Teat Tissue Immune Defences and Intramammary Infections. In : *Biology of the Mammary Gland*. Springer US. pp. 287-293.

Annexes

Annexe 1 : Fiche d'examen clinique général

REIDSOCS	Janvier-Février 2018	ENVT/IHAP		
<u>FICHE D'EXAMEN CLINIQUE ET DE PRELEVEMENTS</u>				
Numéro d'identification :				
Date :	Heure :			
Initiale opérateur :				
<u>Production de lait</u> :	G :	mL / D :	mL / Total :	mL
(si traite)				
<u>Prélèvement de lait</u> :	G :	mL / D :	mL / Total :	mL
<u>Examen général</u>				
<u>Appétit</u> : Conservé, mange spontanément et consomme la totalité de la ration 0 <input type="checkbox"/>				
Diminué 1 <input type="checkbox"/>				
Ne mange pas 2 <input type="checkbox"/>				
<u>Décubitus (difficultés/incapacité à se lever)</u> : Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>				
<u>Abattement</u> : Absent 0 <input type="checkbox"/> Léger 1 <input type="checkbox"/> Marqué 2 <input type="checkbox"/>				
<u>Couleur des muqueuses oculaires</u> : Rosée 0 <input type="checkbox"/> Congestion légère 1 <input type="checkbox"/> Congestion marquée 2 <input type="checkbox"/>				
(conjonctive palpébrale/sclérale)				
<u>Fréquence cardiaque</u> : bpm <u>Tachycardie</u> : Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>				
<u>Fréquence respiratoire</u> : mpm				
<u>Température rectale</u> : 39,0 – 39,5 0 <input type="checkbox"/> 39,5 – 40 1 <input type="checkbox"/> <38,5 ou >40 2 <input type="checkbox"/>				
<u>Déshydratation</u> : Absence 0 <input type="checkbox"/> Légère 1 <input type="checkbox"/> Modérée 2 <input type="checkbox"/> Marquée 3 <input type="checkbox"/>				
(= degré d'énophtalmie)				
<u>Fréquence ruminale</u> : 2 /min 0 <input type="checkbox"/> 1 /min 1 <input type="checkbox"/> 0 /min 2 <input type="checkbox"/>				

REIDSOCS

Janvier-Février 2018

ENVN/IHAP

Examen de la mamelle

HEMIMAMELLE GAUCHE	HEMIMAMELLE DROITE
<u>Couleur</u> : Normale/claire 0 <input type="checkbox"/> Rouge 1 <input type="checkbox"/> Bleue 2 <input type="checkbox"/>	<u>Couleur</u> : Normale/claire 0 <input type="checkbox"/> Rouge 1 <input type="checkbox"/> Bleue 2 <input type="checkbox"/>
<u>Douleur</u> : Absente 0 <input type="checkbox"/> Modérée 1 <input type="checkbox"/> Marquée 2 <input type="checkbox"/>	<u>Douleur</u> : Absente 0 <input type="checkbox"/> Modérée 1 <input type="checkbox"/> Marquée 2 <input type="checkbox"/>
<u>Chaleur</u> : Absente 0 <input type="checkbox"/> Modérée 1 <input type="checkbox"/> Marquée 2 <input type="checkbox"/>	<u>Chaleur</u> : Absence 0 <input type="checkbox"/> Modérée 1 <input type="checkbox"/> Marquée 2 <input type="checkbox"/>
<u>Induration</u> : Absente 0 <input type="checkbox"/> Modérée 1 <input type="checkbox"/> Marquée 2 <input type="checkbox"/>	<u>Induration</u> : Absence 0 <input type="checkbox"/> Modérée 1 <input type="checkbox"/> Marquée 2 <input type="checkbox"/>
<u>Gonflement</u> : Absent 0 <input type="checkbox"/> 1,5 fois 1 <input type="checkbox"/> 2 fois 2 <input type="checkbox"/>	<u>Gonflement</u> : Absence 0 <input type="checkbox"/> 1,5 fois 1 <input type="checkbox"/> 2 fois 2 <input type="checkbox"/>
<u>Abcès</u> : nombre : taille :	<u>Abcès</u> : nombre : taille :
<u>NL rétro-mammaires</u> : Taille normale <input type="checkbox"/> Augmentée <input type="checkbox"/>	<u>NL rétro-mammaires</u> : Taille normale <input type="checkbox"/> Augmentée <input type="checkbox"/>

Examen du lait

HEMIMAMELLE GAUCHE	HEMIMAMELLE DROITE
<u>Couleur</u> : Blanc <input type="checkbox"/> Blanc-jaune décoloré <input type="checkbox"/> Rouge <input type="checkbox"/> Autre <input type="checkbox"/>	<u>Couleur</u> : Blanc <input type="checkbox"/> Blanc-jaune décoloré <input type="checkbox"/> Rouge <input type="checkbox"/> Autre <input type="checkbox"/>
<u>Caractéristiques macroscopiques</u> : Normal 0 <input type="checkbox"/> Normal avec caillé 1 <input type="checkbox"/> Aspect modifié avec caillé et sang 2 <input type="checkbox"/>	<u>Caractéristiques macroscopiques</u> : Normal 0 <input type="checkbox"/> Normal avec caillé 1 <input type="checkbox"/> Aspect modifié avec caillots et sang 2 <input type="checkbox"/>

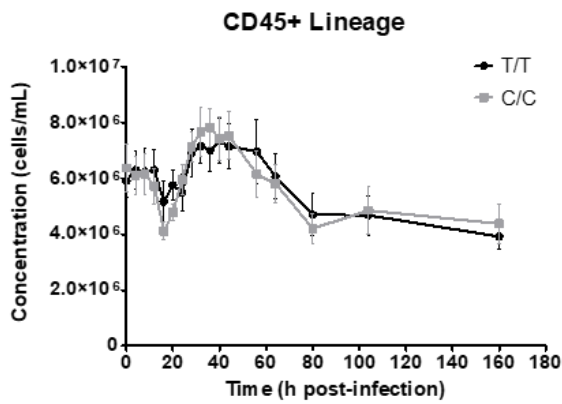
Annexe 3 : détail du calcul des scores généraux

Appétit	0 = mange spontanément et consomme la totalité de la ration 1 = appétit diminué, ne mange qu'une partie de la ration 2 = ne mange pas
Décubitus	0 = comportement normal 1 = incapacité / difficultés majeures à se lever
Abattement	0 = vigilance normal 1 = abattement léger 2 = abattement marqué
Congestion	0 = muqueuses oculaires rosées 1 = muqueuses oculaires légèrement congestionnées 2 = muqueuses oculaires fortement congestionnées
Fréquence cardiaque (FC)	FC de base = moyenne (FC à T-264, T-144, T-96) 0 = FC < FC de base + 20% 1 = FC de base + 20% ≤ FC < FC de base + 40% 2 = FC ≥ FC de base + 40%
Fréquence respiratoire (FR)	FR de base = moyenne (FR à T-264, T-144, T-96) 0 : FR < FR de base + 20% 1 : FR de base + 10% ≤ FR < FR de base + 30% 2 : FR ≥ FR de base + 30%
Température rectale (TR)	0 = 38.5 ≤ TR ≤ 39.5°C 1 = 39.5 < TR < 40°C 2 = TR > 40°C ou TR < 38.5
Déshydratation	0 = absence d'énophtalmie 1 = légère énophtalmie 2 = énophtalmie modérée 3 = énophtalmie marquée
Fréquence ruminale	0 = au moins 2 ruminations par minutes 1 = 1 rumination par minute 2 = absence de rumination
Score général	Somme de tous les scores excepté les scores de décubitus et de déshydratation (score maximal de 14)

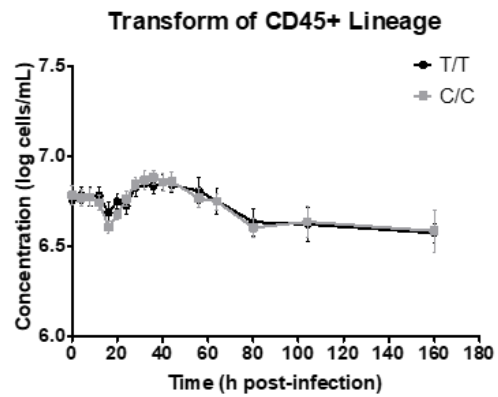
Annexe 4 : détail du calcul des scores mammaires

Couleur de la peau	0 = normale 1 = anormale (rouge ou bleue)
Douleur	0 = absente 1 = présente
Chaleur	0 = absente 1 = présente
Induration	0 = absente 1 = présente
Gonflement	0 = taille normale 1 = volume x 1.5 2 = volume x 2
Abcès	0 = absence 1 = 1 abcès >1cm ou 1 à 3 < 4 abcès mm 3 = >1 abcès de 1cm mini et >3 abcès mm
Nœuds lymphatiques	0 = taille normale 1 = augmentation modérée 2 = augmentation marquée
Couleur du lait	0 = blanc 1 = anormal (rose, rouge, blanc-décoloré)
Caractéristiques macroscopiques du lait	0 = aspect normal 1 = aspect anormal (grumeaux, sang)
Score mammaire	Somme de tous les scores (1 score par hémimamelle)

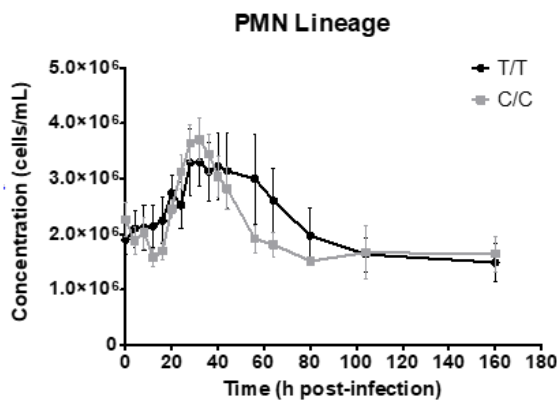
Annexe 5 : Profils cellulaires sanguins des grandes lignées de leucocytes (Lineage staining) pour chaque génotype C/C ou T/T



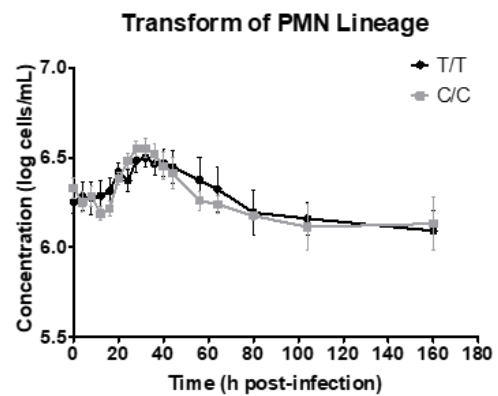
Paired t-test
 $p = 0.6914$



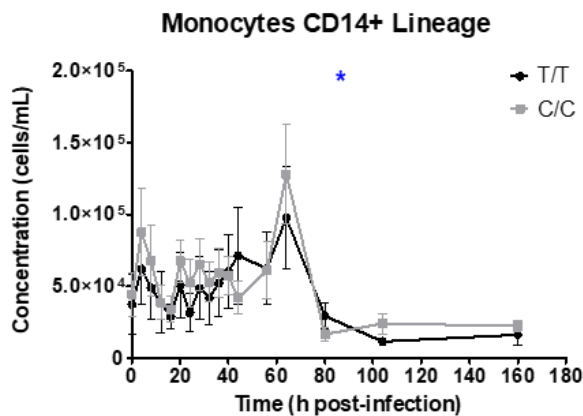
Paired t-test
 $p = 0.6065$



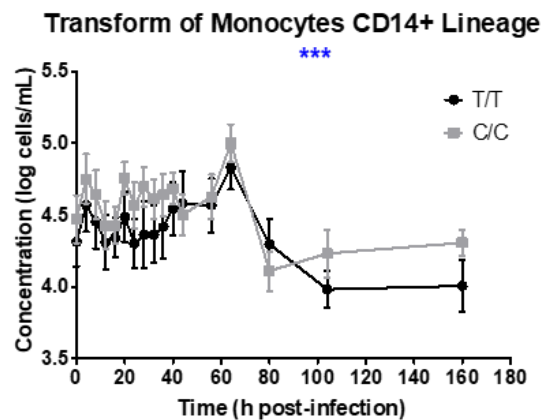
Paired t-test
 $p = 0.2487$



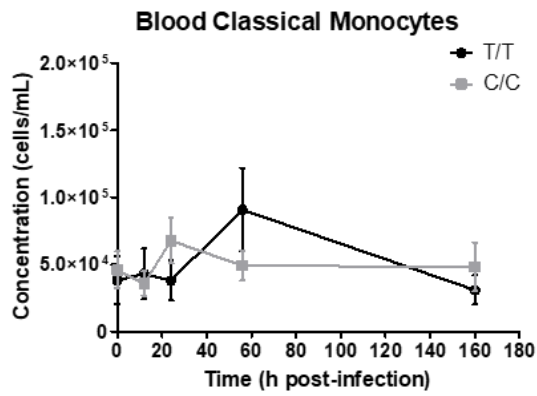
Paired t-test
 $p = 0.5509$



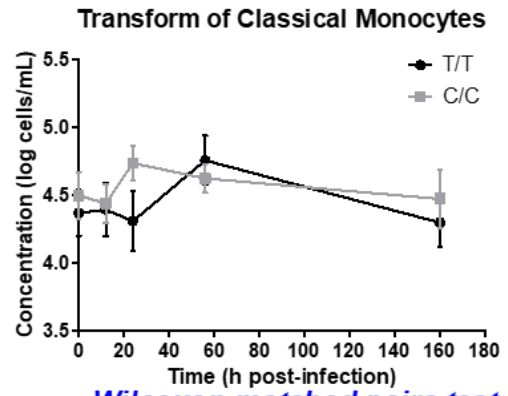
Wilcoxon matched pairs test
 $p = 0.0373$



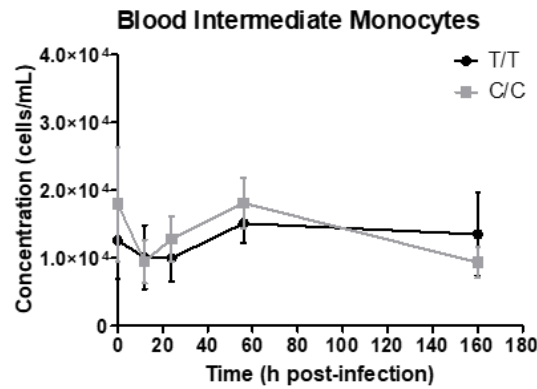
Paired t-test
 $p = 0.0002$



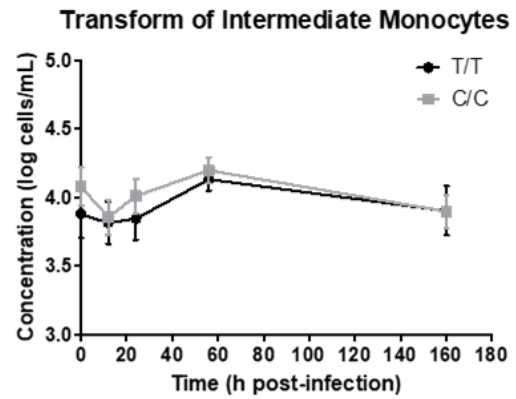
Wilcoxon matched pairs test
 $p = 0.8125$



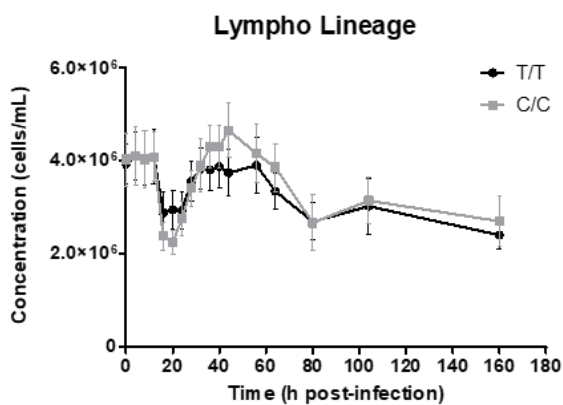
Wilcoxon matched pairs test
 $p = 0.3125$



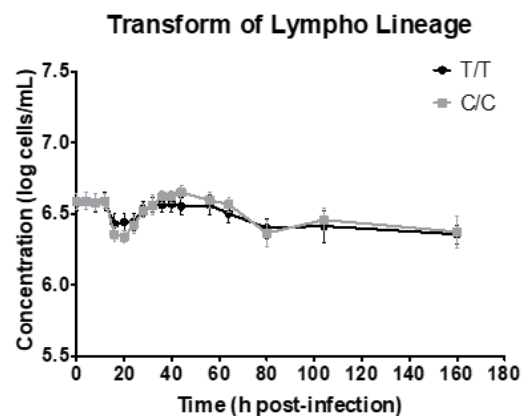
Wilcoxon matched pairs test
 $p = 0.6250$



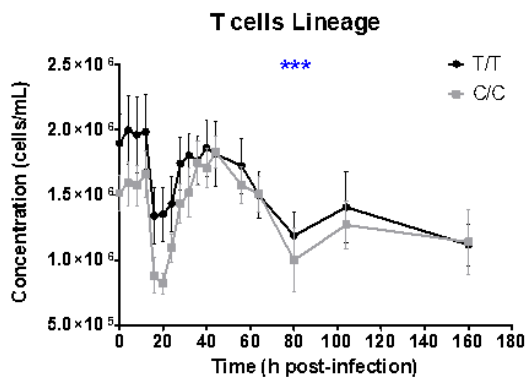
Paired t-test
 $p = 0.0720$



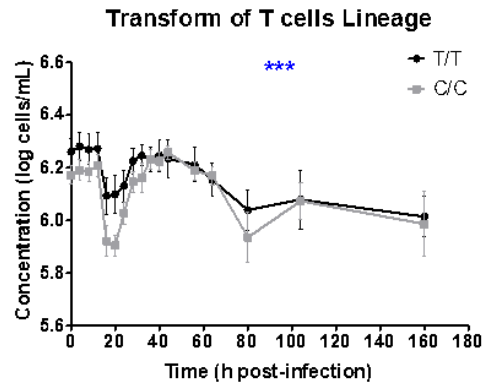
Paired t-test
 $p = 0.3262$



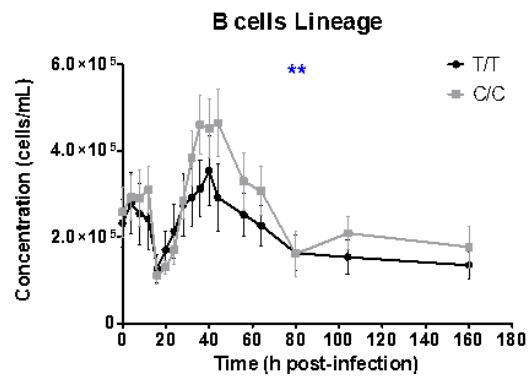
Paired t-test
 $p = 0.5396$



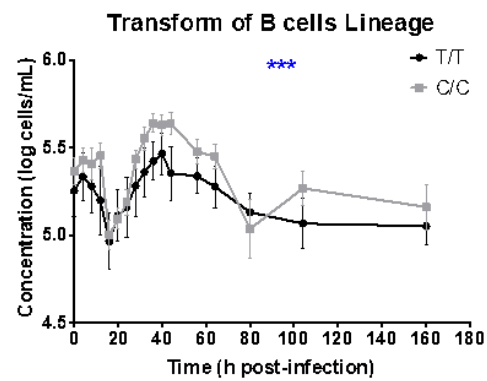
Paired t-test
 $p < 0.0001$



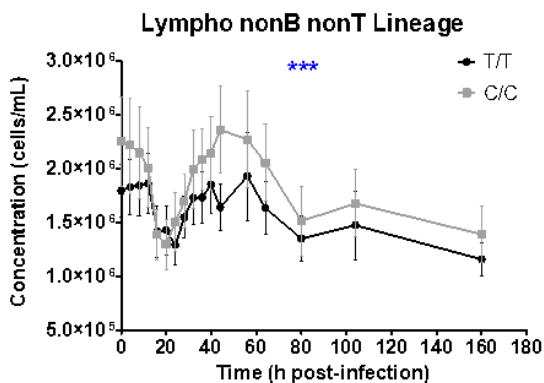
Paired t-test
 $p = 0.0005$



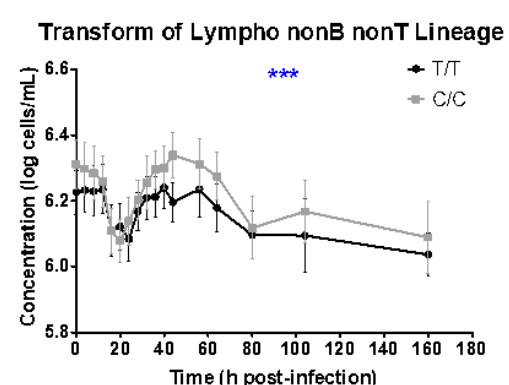
Paired t-test
 $p = 0.0046$



Paired t-test
 $p < 0.0001$

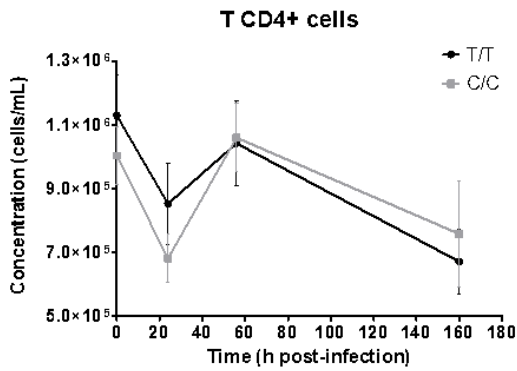


Paired t-test
 $p < 0.0001$

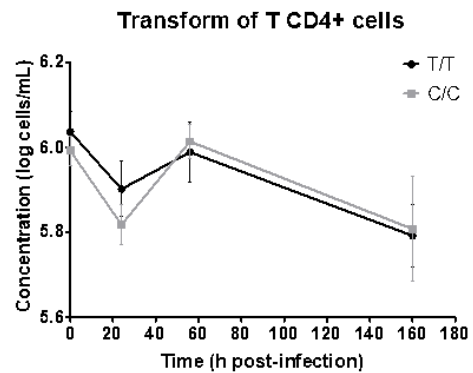


Paired t-test
 $p < 0.0001$

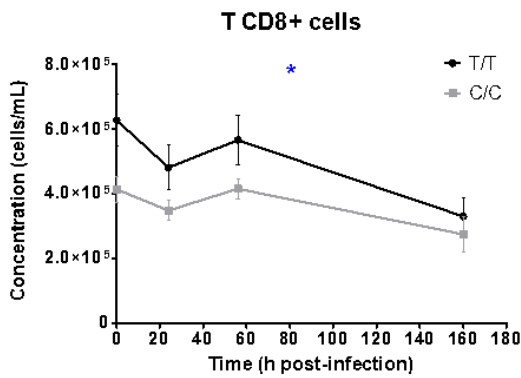
Annexe 6 : Profils cellulaires sanguins des sous-classes de lymphocytes T (T cells staining) pour chaque génotype C/C ou T/T



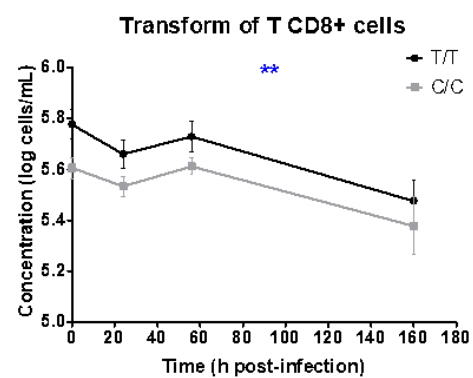
Wilcoxon matched pairs test
 $p = 0.6250$



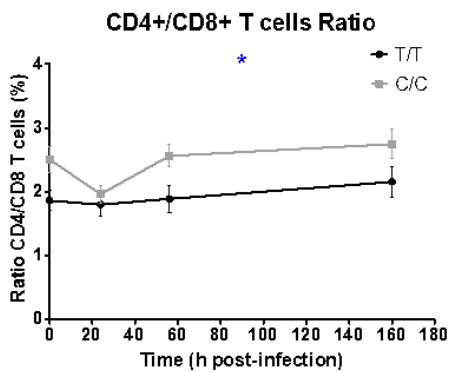
Paired t-test
 $p = 0.4562$



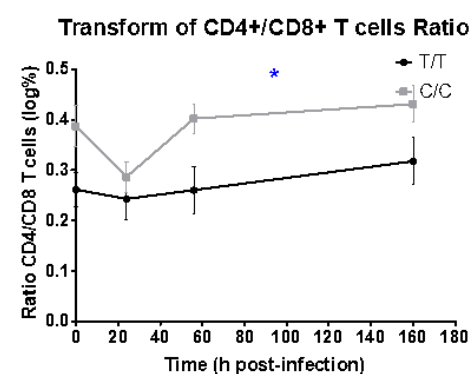
Wilcoxon matched pairs test
 $p = 0.0240$



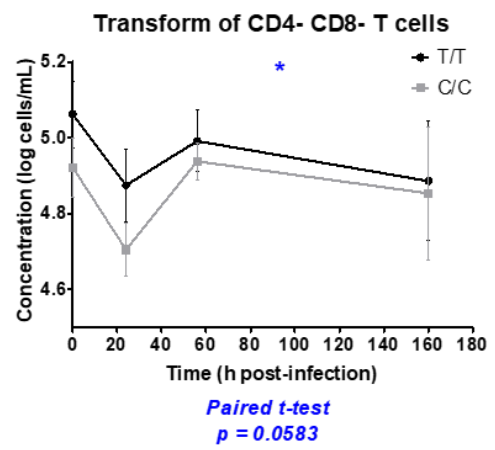
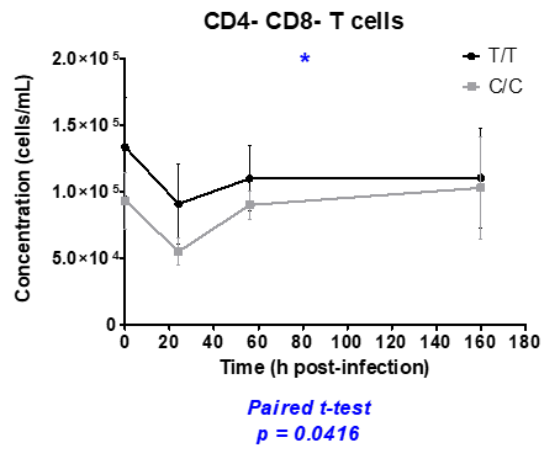
Paired t-test
 $p = 0.0036$



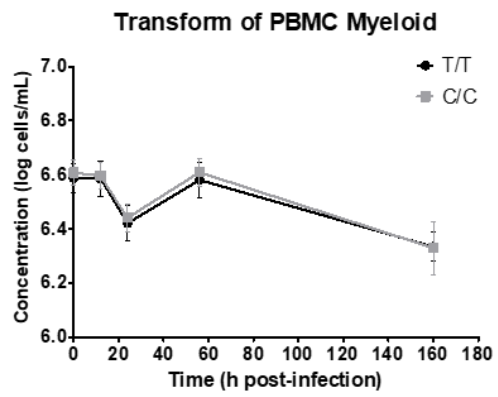
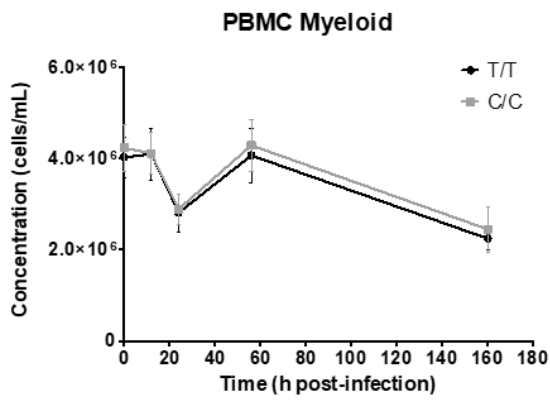
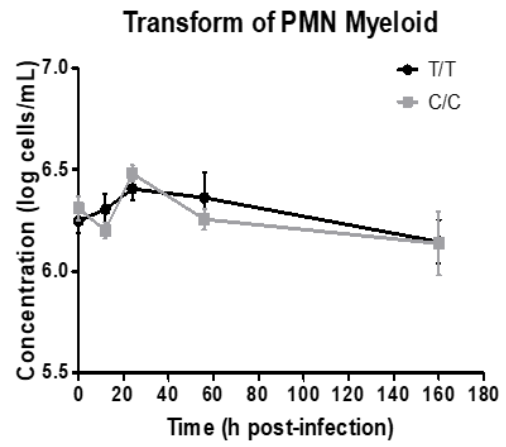
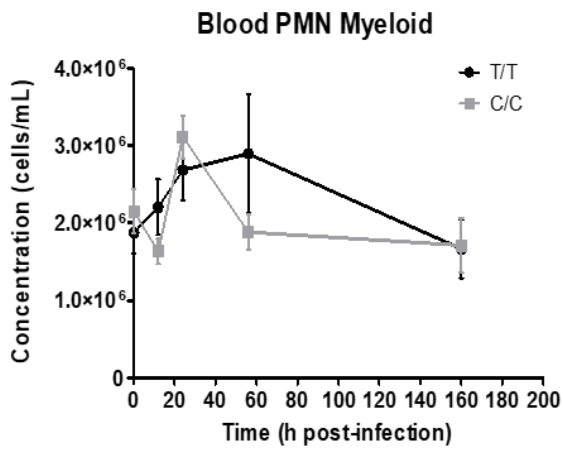
Wilcoxon matched pairs test
 $p = 0.0260$



Paired t-test
 $p = 0.0163$

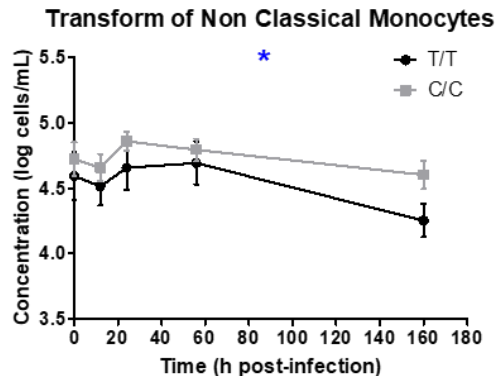
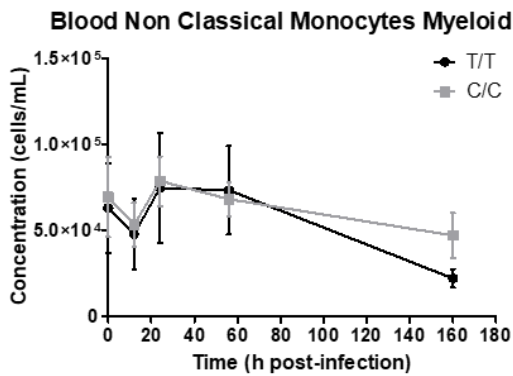


Annexe 7 : Profils cellulaires des lignées myéloïde de leucocytes (Myeloid staining) pour chaque génotype C/C ou T/T



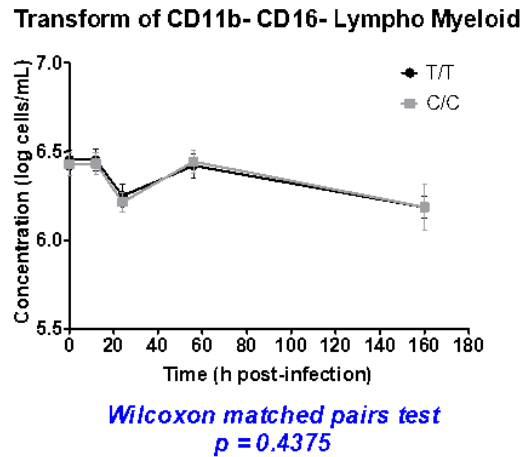
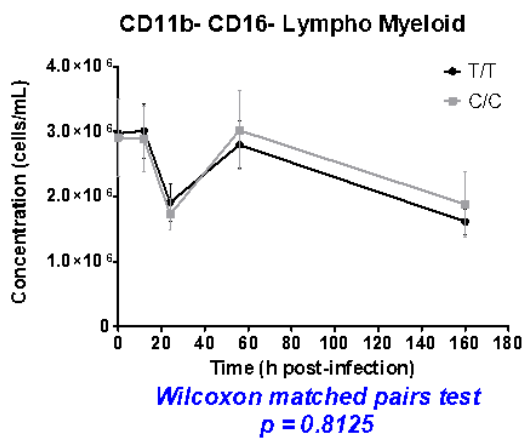
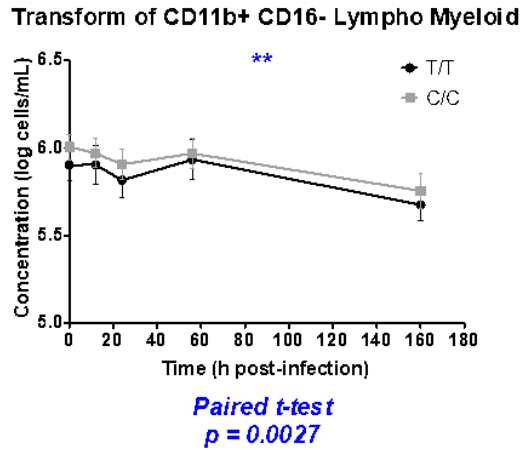
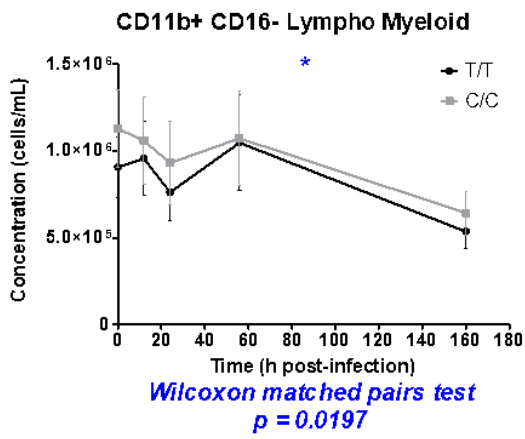
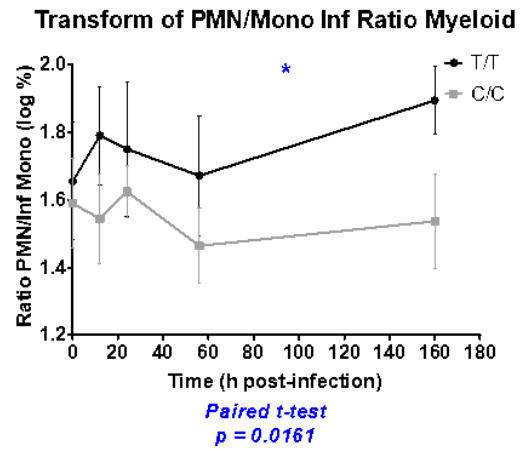
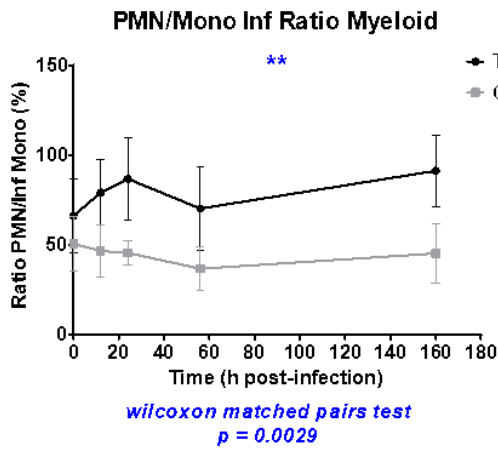
wilcoxon matched pairs test
p = 0.0625

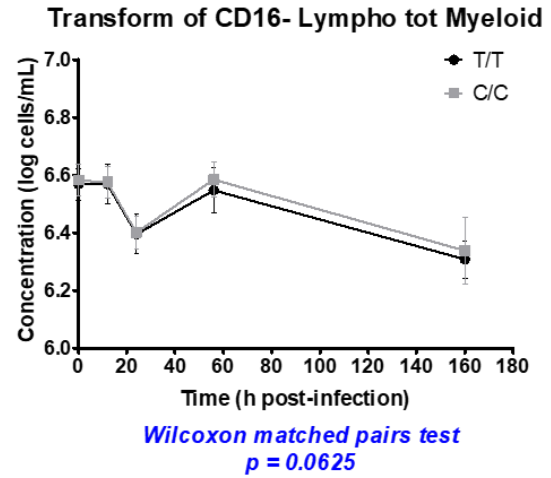
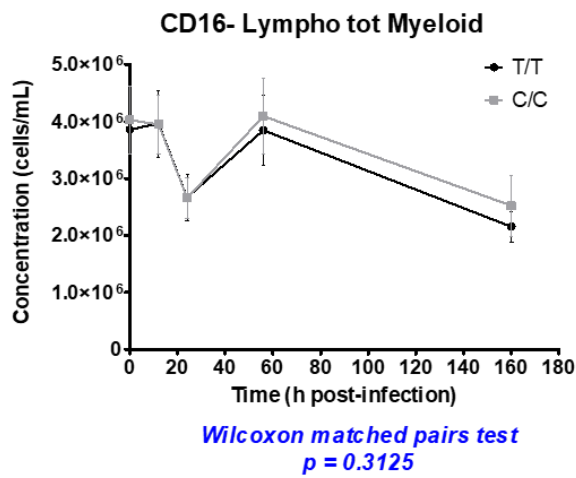
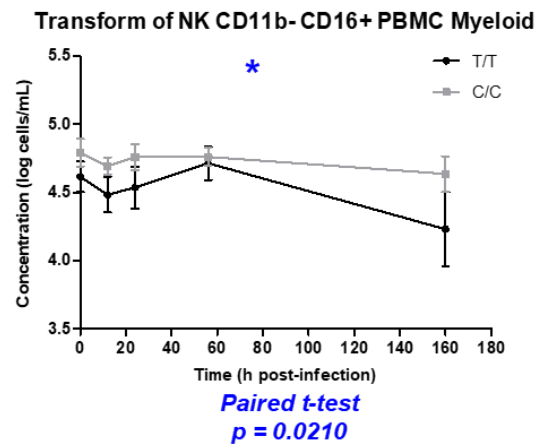
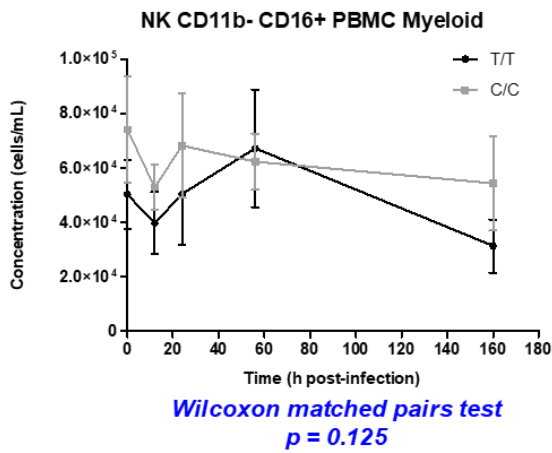
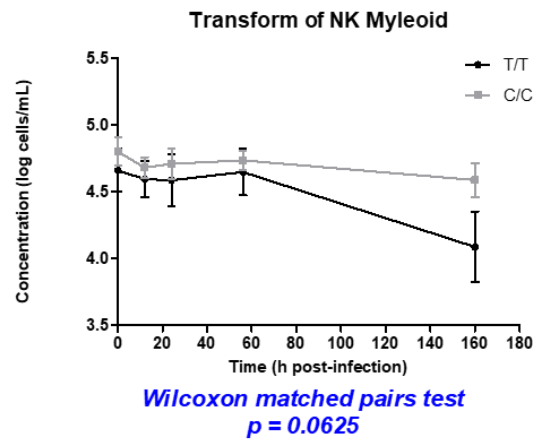
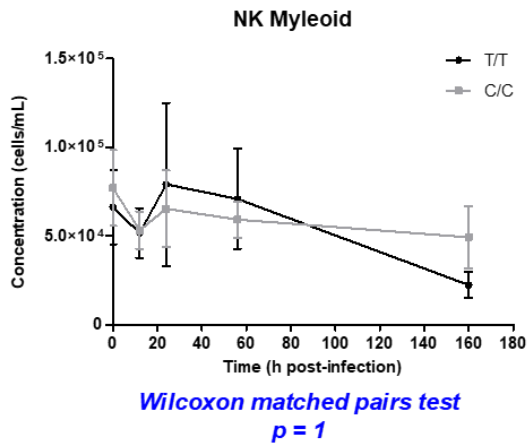
Paired t-test
p = 0.1250



Wilcoxon matched pairs test
p = 0.1875

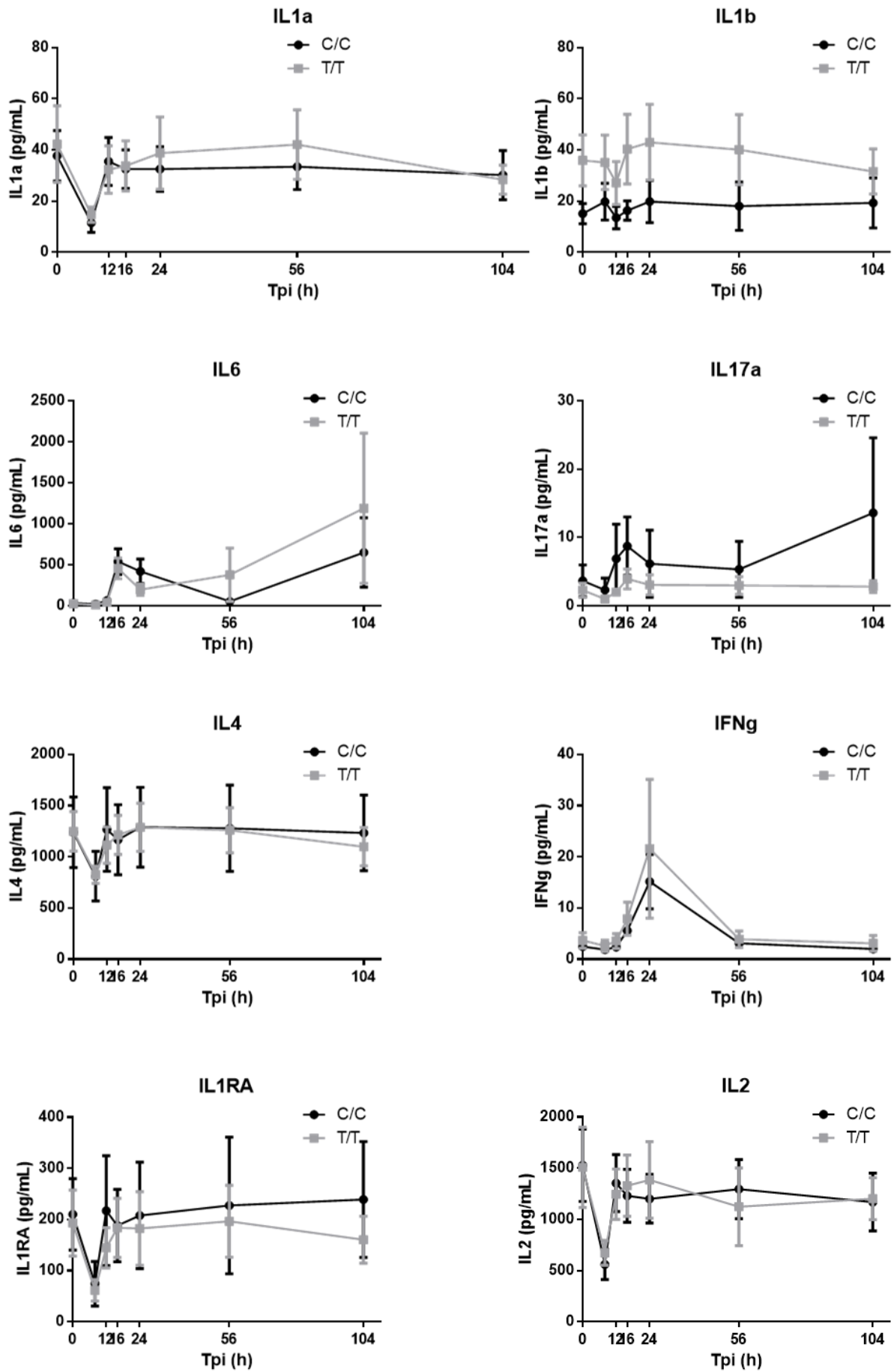
Paired t-test
p = 0.0139

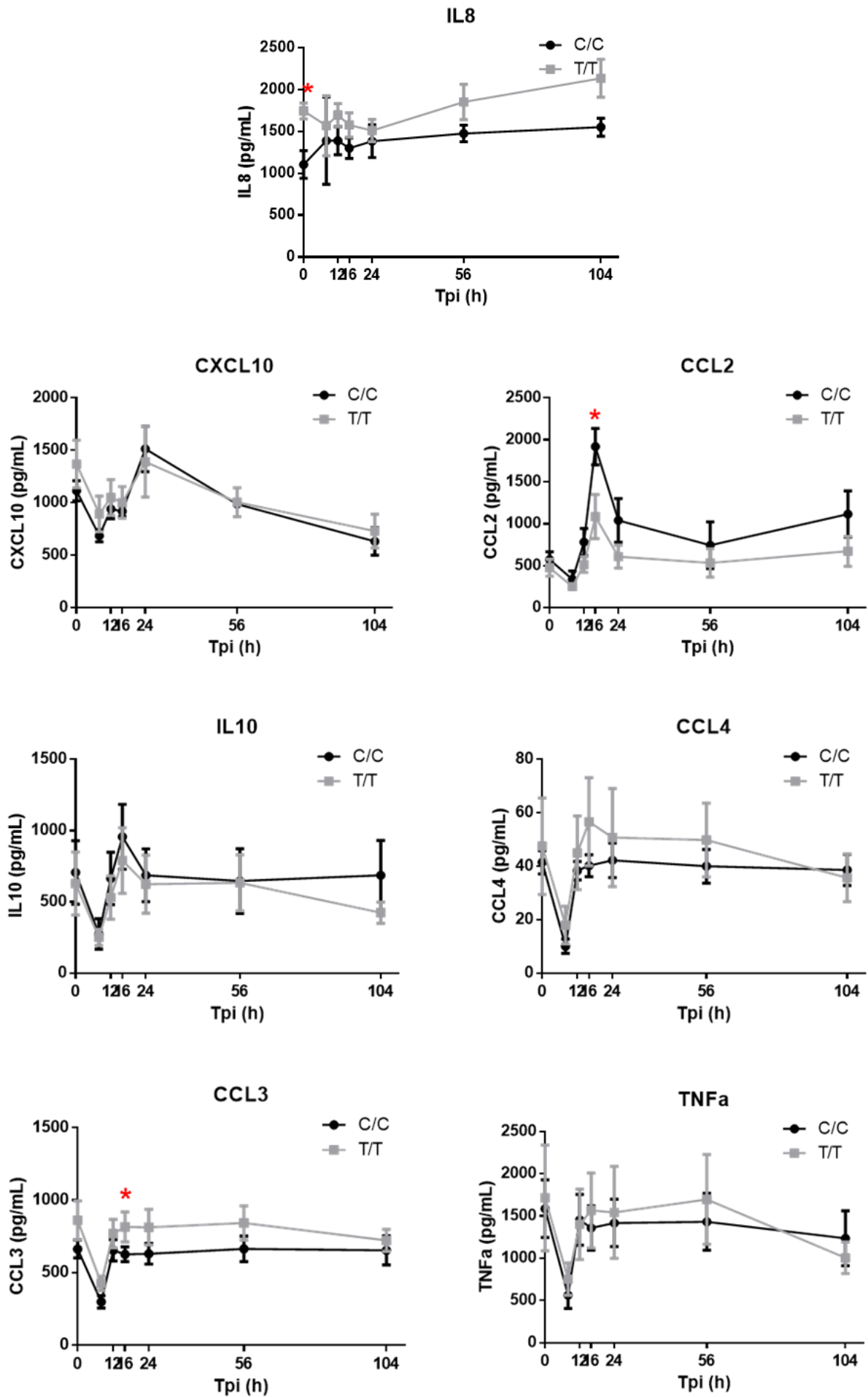




Annexe 8 : Profils cytokiniques plasmatiques pour chaque génotype C/C et T/T

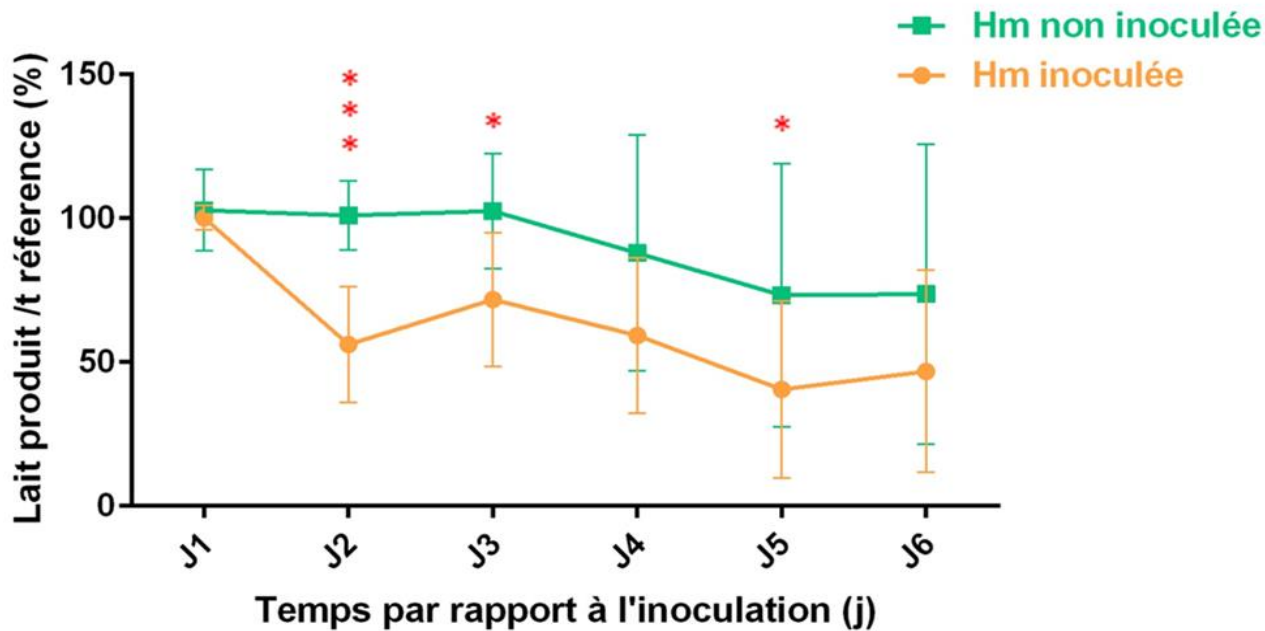
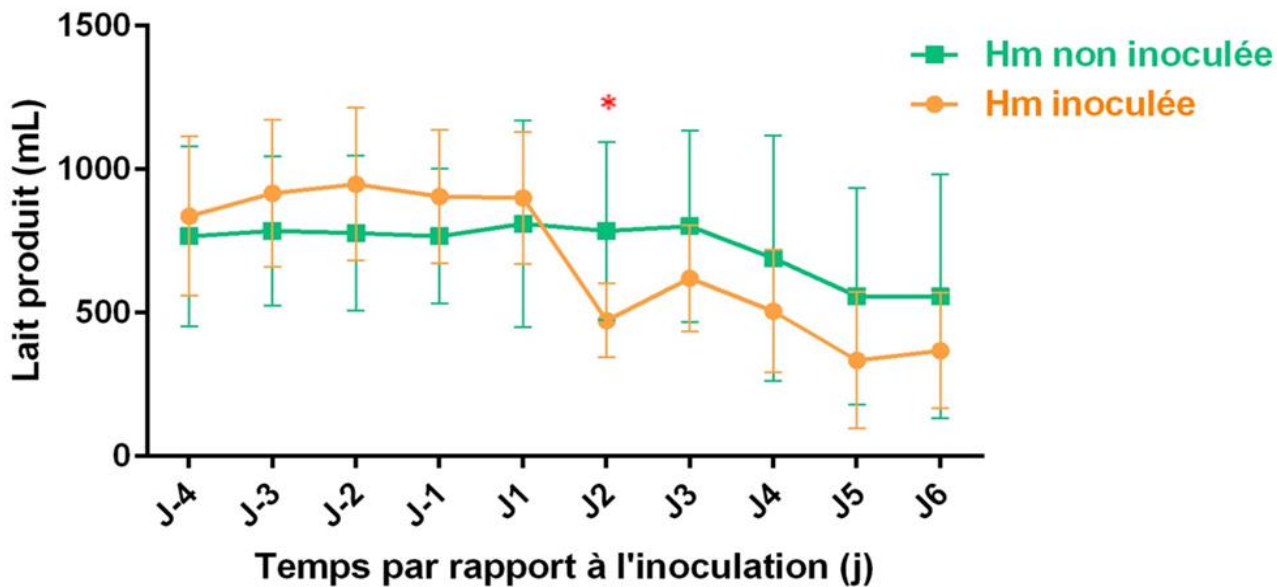
Tests statistiques : Paired t-test/Wilcoxon matched pairs test





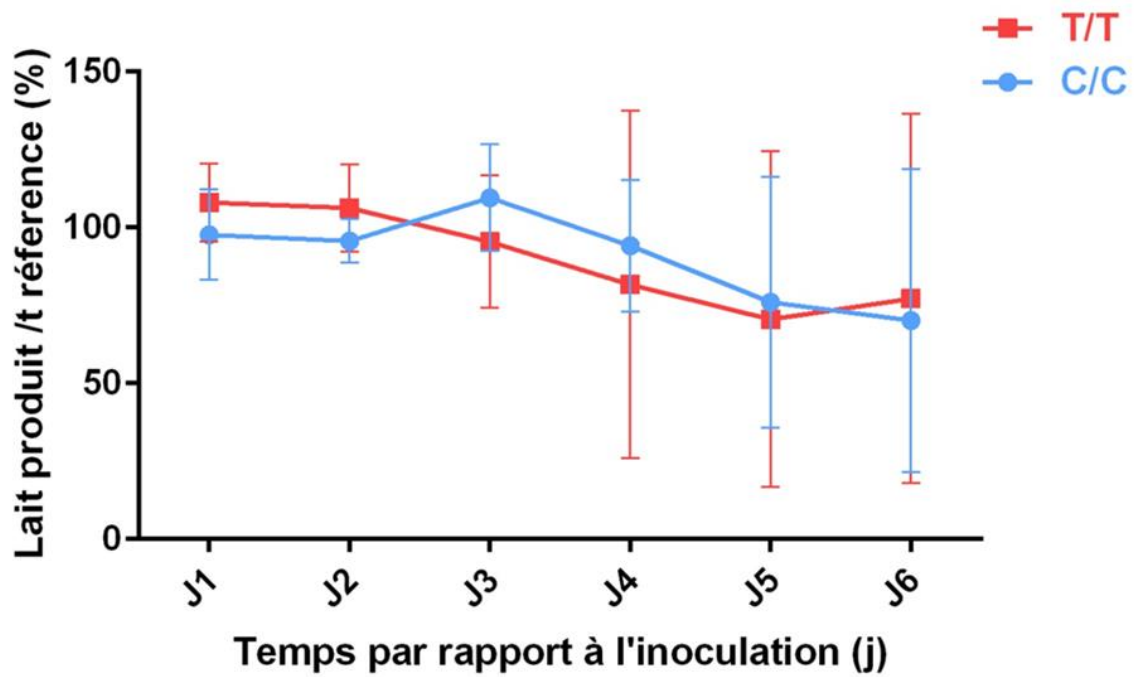
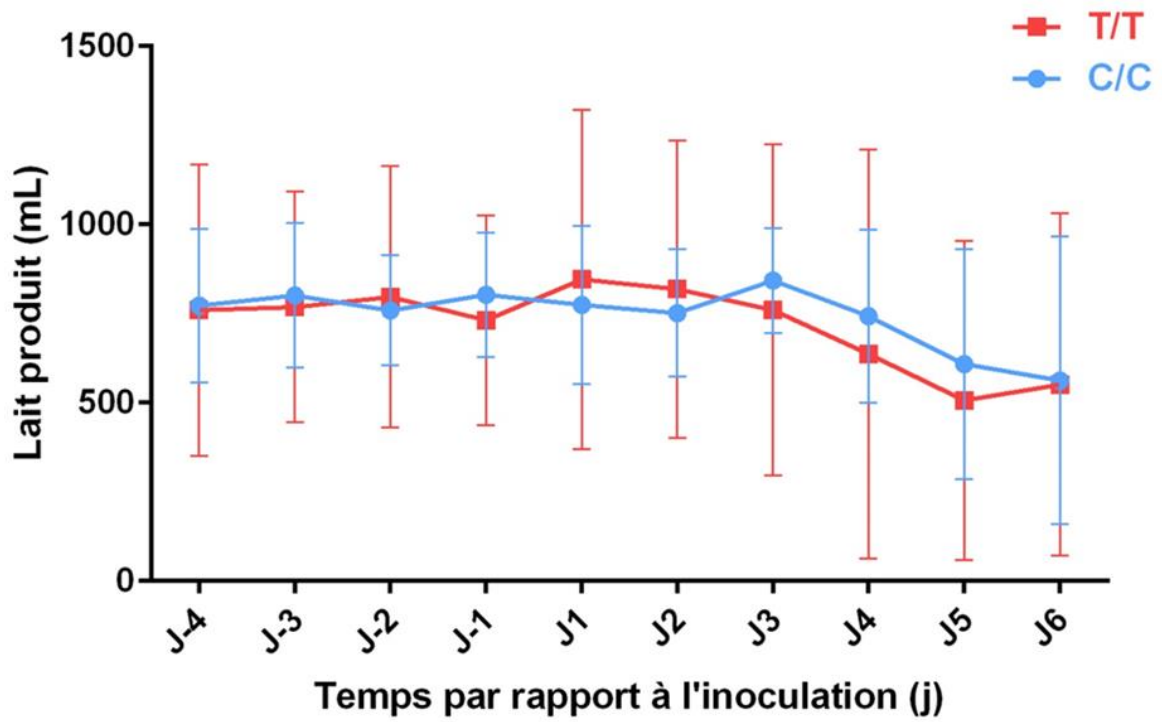
Annexe 9 : Evolution de la production laitière selon le statut infection de l'hémimamelle

Test statistique : 2way ANOVA



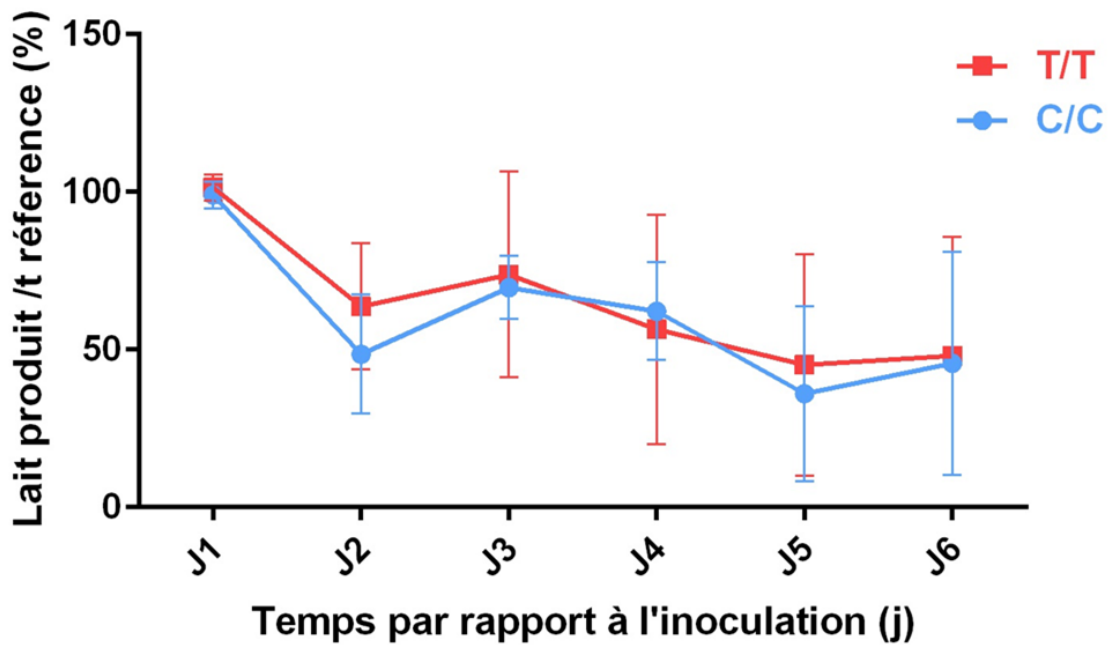
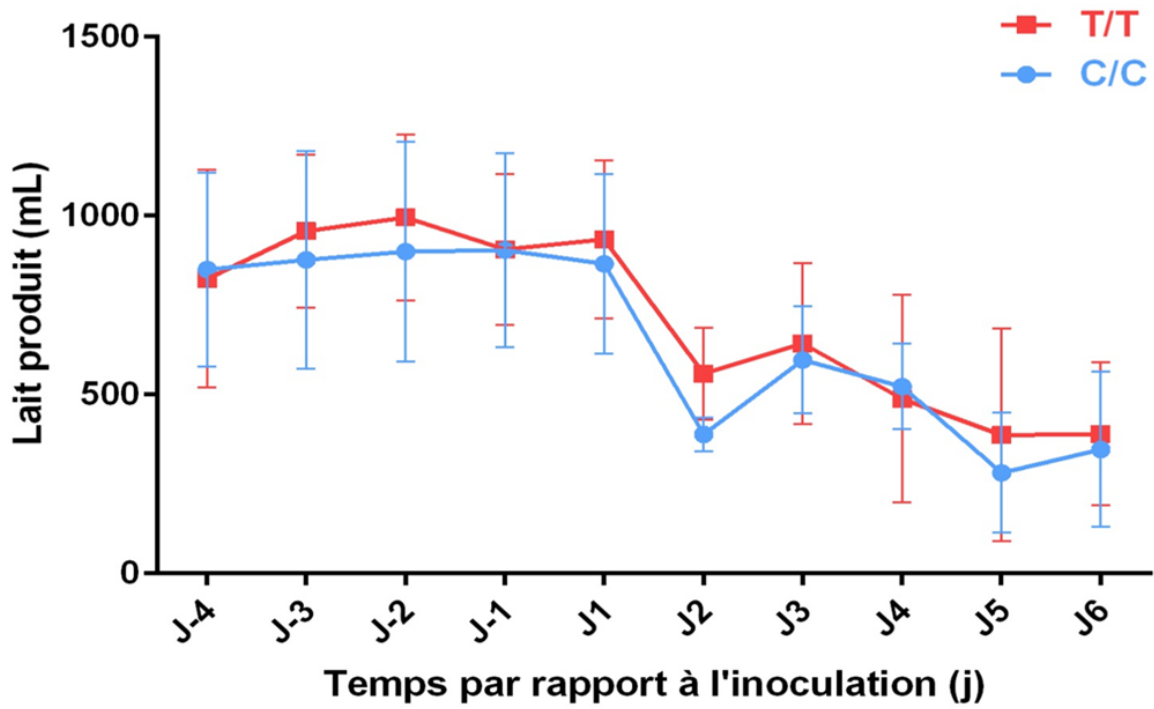
Annexe 10 : Evolution de la production de lait de l'hémimamelle non inoculée selon le génotype Socs2

Test statistique : 2way ANOVA



Annexe 11 : Evolution de la production de lait de l'hémimamelle non inoculée selon le génotype Socs2

Test statistique : 2way ANOVA



Titre : Effet du gène Socs2 sur la réponse inflammatoire systémique lors de mammité à *Staphylococcus aureus*

Résumé :

Les mammites représentent une dominante pathologique majeure en élevage laitier, avec un impact économique pouvant être considérable. La lutte contre les mammites nécessite de mettre en place diverses mesures préventives. La sélection génétique en fait partie, grâce à la découverte d'une mutation ponctuelle de la protéine SOCS-2 dans la race Lacaune, significativement associée à des CCS élevées. L'objectif de ce travail est de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de cette sensibilité, en ciblant la réaction inflammatoire systémique apparaît lors de mammité. La comparaison des réponses systémiques entre les deux lignées face à une infection mammaire à *Staphylococcus aureus* a permis de mettre en évidence des différences dans le recrutement des lymphocytes CD14^{low} CD16-, des lymphocytes B et des cellules NK. Des différences de concentrations en IL8, CCL2 et CCL3, possédant un fort pouvoir chimioattractif, ont aussi été observées.

Mots clefs : Brebis, mammites, SOCS 2, *Staphylococcus aureus*

Title : Effect of the Socs2 gene on the systemic inflammatory response in *S. aureus* mastitis

Abstract : Mastitis is a major disease in the dairy industry, with a huge economic impact. Various preventive measures are required to limit occurrence of mastitis. Genetic selection is one of them, thanks to the discovery of a point mutation in the SOCS-2 protein, that is significantly associated with high SCC, in the Lacaune breed. The aim of this experiment is to better understand the underlying mechanisms of the predisposition, targeting the systemic inflammatory response that develops during mastitis. Comparison of the systemic responses between the two genetic groups against *Staphylococcus aureus* udder infection revealed differences in CD14^{low} CD16- cell, B lymphocyte and NK cell recruitment. Differences in IL-8, CCL2 and CCL3 concentrations with known high chemoattractant potency were also observed

Keys words : Ewes, mastitis, SOCS 2, *Staphylococcus aureus*