




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/> 26119

To cite this version:

Frayssignes, Laurence . *Réponse inflammatoire mammaire et effet d'une mutation de SOCS-2 lors de mammite à Staphylococcus aureus chez la brebis Lacaune*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2019, 124 p.

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

REPONSE INFLAMMATOIRE MAMMAIRE ET EFFET D'UNE MUTATION DE SOCS-2 LORS DE MAMMITE A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CHEZ LA BREBIS LACAUNE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

Laurence FRAYSSIGNES

Née, le 24 juillet 1993 à MONTAUBAN (82)

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 ECOLE
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*

MAÎTRES 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**, *Ophthalmologie 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**, *Ophthalmologie*
- 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

Au Président de thèse,

Monsieur le Professeur Eric Oswald

DVM, PU- PH au Centre Hospitalier Universitaire de Purpan

Bactériologie

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

Hommages respectueux.

Au jury de thèse,

Monsieur le Professeur Gilles Foucras

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des ruminants – UMR IHAP, Immunologie

Pour m'avoir accompagnée avec disponibilité et bienveillance dans la réalisation de cette thèse, veuillez accepter mes sincères remerciements.

Monsieur le Docteur Dominique Bergonier

Maître de Conférence à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la reproduction

Pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse,
sincères remerciements.

Sommaire

Index des tableaux.....	11
Index des figures.....	13
Liste des abréviations.....	15
Introduction générale.....	17
Chapitre 1 : Étude bibliographique.....	21
<i>1. Origine et détection des mammites chez la brebis</i>	<i>25</i>
1.1. Étiologie.....	25
1.2. Suspicion clinique.....	27
1.3. Détection des infections intra-mammaires	29
1.3.1. <i>Diagnostic direct.....</i>	<i>29</i>
1.3.2. <i>Diagnostic indirect.....</i>	<i>30</i>
<i>2. Pathogénie de l'infection et réponse inflammatoire</i>	<i>34</i>
2.1. Structure et défenses physico-chimiques de la mamelle.....	34
2.1.1. <i>Structure anatomique et histologique de la mamelle de la brebis</i>	<i>34</i>
2.1.2. <i>Défenses de la mamelle.....</i>	<i>37</i>
2.2. Réaction immunitaire lors d'infection intra-mammaire	37
2.2.1. <i>Réponse immunitaire innée</i>	<i>37</i>
2.2.2. <i>Réponse immunitaire acquise</i>	<i>43</i>
2.3. Cas de Staphylococcus aureus : immunogénicité et facteurs de virulence	47
2.3.1. <i>Structure.....</i>	<i>47</i>
2.3.2. <i>Facteurs de virulence</i>	<i>48</i>
<i>3. Problématique des mammites et ses solutions, à l'échelle de l'élevage et de la filière.49</i>	
3.1. Facteurs de risque des mammites	49
3.1.1. <i>Facteurs individuels.....</i>	<i>49</i>
3.1.2. <i>Facteurs liés à la traite</i>	<i>50</i>
3.1.3. <i>Facteurs de conduite d'élevage</i>	<i>51</i>

3.2. Prise en charge et prévention	51
3.2.1. Éléments liés à la conduite d'élevage	52
3.2.2. Facteurs liés à la traite	52
3.2.3. Utilisation de produits vétérinaires	53
3.3. Sélection génétique des ovins laitiers	54
3.3.1. Organisation de la sélection des races ovines laitières françaises.....	54
3.3.2. Évaluation des performances et sélection classique.....	57
3.3.3. Evolution vers la sélection génomique.....	58
Chapitre 2 : Étude expérimentale.....	63
1. Matériel & Méthodes.....	67
1.1. Les brebis	67
1.2. L'inoculation	67
1.3. La collecte des données phénotypiques en relation avec la santé de la mamelle	69
1.3.1. Mise en œuvre des examens cliniques et prélèvements	69
1.3.2. Analyses de laboratoire.....	71
1.3.3. Date de mesure et répartition des analyses	72
1.4. Analyse des données	74
1.4.1. Mise en forme de la production journalière par héli-mamelle	74
1.4.2. Score clinique mammaire	74
1.4.3. Transformation des CCS en SCS	75
1.4.4. Score Histologique	75
1.4.5. Analyses statistiques	75
2. Résultats.....	76
2.1. Analyse de la réaction inflammatoire consécutive à l'inoculation	76
2.1.1. Caractères cliniques	76
2.1.2. Caractères biologiques	78
2.1.3. Caractères lésionnels.....	79
SOCS-2	84
2.2. Caractérisation phénotypique de la réaction immunitaire et effet de la mutation de	84
2.2.2. Caractères biologiques	85
2.2.3. Caractères lésionnels.....	89

3. Discussion.....	92
3.1. Intérêt de l'étude	92
3.1.1. <i>La place de la sélection des races dans la prévention des mammites</i>	92
3.1.2. <i>L'intérêt de l'étude du support génétique de la résistance aux mammites</i>	92
3.2. Modalités de l'expérimentation	93
3.2.1. <i>Les animaux</i>	93
3.2.2. <i>L'inoculation</i>	93
3.2.3. <i>Le suivi des animaux</i>	94
3.2.4. <i>Les analyses</i>	95
3.3. Résultats.....	97
3.3.1. <i>Traduction clinique, biologique et lésionnelle de l'infection expérimentale</i> ...	97
3.3.2. <i>Différences phénotypiques entre les deux génotypes SOCS-2</i>	98
3.4. Perspectives	99
Conclusion.....	100
Sources bibliographiques.....	105
Annexes	117
<i>1. Choix de l'hémi-mamelle à inoculer en fonction des SCS et des résultats de culture</i>	119
<i>2. Evolution des taux du lait au cours de l'expérimentation</i>	120
<i>3. Lésions macroscopiques observées lors de l'autopsie</i>	121
<i>4. Lésions microscopiques observées lors de l'examen histopathologique</i>	122
<i>5. Evolution de la production laitière relative par hémi-mamelle et par groupe</i>	123
<i>6. Évaluation de l'impact de SOCS2 sur la croissance – taille des os longs</i>	124

Index des tableaux

Tableau 1: Réservoir principal et fréquence relative des bactéries responsables de mammites cliniques et subcliniques chez les brebis (d'après Bergonier et Poumarat 1996, Bergonier et al. 1997, Saratsis et al. 1998, Menzies et Ramanan, 2001, Bergonier et Berthelot 2002, Bergonier et al. 2003, Mork et al. 2007)	26
Tableau 2: Importance des schémas de sélection des races ovines laitières françaises en 2014 (Source : Idele et CNBL 2015) (Astruc et al. 2016).....	56
Tableau 3: Caractères génétiques sélectionnés et progrès génétique annuel par race en 2014 (Source : Idele et CNBL 2015) (Barillet et al. 2016)	57
Tableau 4: Examens et analyses effectués à chaque point de contrôle.....	73
Tableau 5: Évaluation du score clinique mammaire.....	74
Tableau 6: Évaluation du score histologique.....	75
Tableau 7: Nombre de brebis de chaque génotype présentant des lésions macroscopiques	89
Tableau 8: Score histologique moyen des hémi-mamelles inoculées des brebis des deux génotypes.....	91
Tableau 9: Comparaison des CCS moyennes des hémi-mamelles inoculées de chaque groupe en fonction de la technique de comptage utilisée.....	96

Index des figures

Figure 1: Principaux pathogènes impliqués dans les mammites cliniques en fonction du stade de lactation	27
Figure 2 : Profils de mamelles anormaux.....	28
Figure 3: Coupe transversale d'une héli-mamelle de brebis (d'après Barone, 1990)	35
Figure 4: Coupes histologiques d'une mamelle saine.....	36
Figure 5: Étapes du recrutement des neutrophiles au site de l'inflammation : attraction par chimiotactisme, adhérence à l'endothélium vasculaire et diapédèse des neutrophiles (d'après Tizard, 2009)	40
Figure 6: Étapes de la phagocytose d'une bactérie (d'après Tizard, 2009)	41
Figure 7: Organisation structurale de la bactérie <i>Staphylococcus aureus</i> (Lowy 1998)	48
Figure 8: Organisation pyramidale de la population des races ovines laitières françaises (France Génétique Elevage 2010; Barillet et al. 2016)	55
Figure 9: Comparaison des schémas de sélection classique et génomique dans la race Lacaune (Astruc et Buisson 2019)	62
Figure 10: Inoculation d'une glande mammaire	68
Figure 11: Évolution de la production laitière relative journalière par héli-mamelle	77
Figure 12: Évolution du score clinique mammaire de chaque héli-mamelle	78
Figure 13: Évolution des taux cellulaires de chaque héli-mamelle.....	79
Figure 14: Lésions macroscopiques observées sur les héli-mamelles inoculées	80

Figure 15: Poids des hémi-mamelles et des nœuds lymphatiques : comparaison des hémi-mamelles inoculées et non inoculées.....	81
Figure 16: Coupe histologiques d'hémi-mamelles inoculées.....	82
Figure 17: �volution du score clinique mammaire moyen des brebis de génotype sauvage (C/C) et de celles porteuses de la mutation de <i>Socs2</i> (T/T).....	84
Figure 18: �volution de la concentration moyenne en <i>S. aureus</i> par culture conventionnelle (a) et qPCR (b) dans le lait selon le génotype des brebis	85
Figure 19: �volution des CCS (a) et SCS (b) de l'hémi-mamelle inoculée en fonction du génotype des brebis	86
Figure 20: �volution des populations leucocytaires du lait en fonction du génotype des brebis	87
Figure 21: �volution des proportions des sous-populations leucocytaires du lait selon le génotype des brebis	88
Figure 22: Poids moyens des hémi-mamelles (a) et des nœuds lymphatiques (b) selon le génotype des brebis	90

Liste des abréviations

3SR : Sustainable Solution for Small Ruminants
ADN : Acide Désoxyribo Nucléique
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
BCR : B Cell Receptor
CCS : Concentration en Cellules Somatiques
CD : Cellules Dendritiques
CIAL SO : Centre Interprofessionnel d'Analyses Laitière du Sud-Ouest
CLO : Contrôle Laitier Officiel
CLQP : Contrôle Laitier Qualitatif Ponctuel
CLS : Contrôle Laitier Simplifié
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMT : Californian Mastitis Test
COX 2 : Cyclo-Oxygénase 2
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
DAMP : Damage Associated Molecular Pattern
DL : Déséquilibre de Liaison
ENVT : École Nationale Vétérinaire de Toulouse
hpi : heures post-inoculation
IA : Insémination Artificielle
ICAR : International Committee for Animal Recording
IDELE : Institut de l'Élevage
IFN γ : Interféron γ
Ig : Immunoglobulines
IIM : Infection intra-mammaire
IL 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 23 : Interleukines 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 23
INRA : Institut National de Recherche Agronomique
ISOL : Index de Synthèse Ovin Laitière
ISOLg : Index de Synthèse Ovin Laitière génomique
JAK-STAT : Janus Kinase – Signal Transducer and Activator of Transcription
MAC : Membrane Attack Complex

MN : Monte Naturelle
MSCRAMM : Microbial-Surface Components Reconizing Adhesive Matrix Molécules
MVV : Virus Visna-Maëdi
NOS 2 : Nitric Oxide Synthase 2
NOX : NADPH Oxygenase
PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern
PCR : Polymerase Chain Reaction
PGE2 : Prostaglandines E2
PRR : Pattern Recognition Receptor
QTL : Quantitative Trait Loci
REIDSOCS : Robustness, Efficiency, Inflammation and Diseases under the control of SOCS2
ROLP : Races Ovines Laitières des Pyrénées
SAG : Sélection Assisté par Gènes
SAM : Sélection Assistée par Marqueurs
SCM : Score clinique mammaire
SCN : Staphylocoques Coagulase-négatifs
SCS : Score de Cellules Somatiques
SG : Sélection Génomique
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SOCS : Suppressors Of Cytokine Signalling
TB : Taux Butyreux
TCR : T Cell Receptor
TGF β : Tumor Growth Factor β
Th : T helper
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
TP : Taux Protéique
TSST-1 : Toxic Shock Syndrome Toxin 1

Introduction générale

Les mammites sont une problématique sanitaire et économique majeure dans les troupeaux de ruminants laitiers, de par leur impact sur la production et par extension sur les filières laitière et fromagère. Les mammites peuvent en effet avoir des conséquences :

- au niveau sanitaire : l'ingestion de produits laitiers contaminés par des bactéries pathogènes (ex : *Staphylococcus aureus*) ou par leurs toxines peut conduire au développement de toxi-infections chez l'Homme (Little et al. 2008; Rosengren et al. 2010),
- d'un point de vue technologique : les modifications de la composition du lait lors de mammité diminuent l'efficacité de la transformation en fromages, voire le rendent impropre à la consommation et en font une non-valeur économique (Delacroix- Buchet, Barillet, et Lagriffoul 1994).

Afin d'assurer la qualité bactériologique des produits laitiers, la législation européenne a mis en place des critères microbiologiques qui servent de normes à respecter (CE n°2073/2005 modifié) (Règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires s. d.).

Cet impact des mammites sur les filières se traduit à l'échelle de l'élevage, notamment par une rémunération du lait basée sur la qualité du lait produit. Toute altération de la quantité et de la qualité de la production en lien avec les mammites entraîne un manque à gagner pour l'éleveur (Giadinis et al. 2012; Astruc 2017). Dans un objectif de rentabilité, la gestion des mammites constitue donc un enjeu économique majeur pour les élevages de ruminants laitiers.

Les mammites résultant essentiellement d'infections d'origine bactérienne, leur prise en charge thérapeutique requiert l'administration d'antibiotiques à l'animal, par voie locale et/ou générale. Cependant, l'efficacité de ces molécules est confrontée au développement de résistances de certaines espèces bactériennes à différents antibiotiques. À l'échelle nationale, la base de données Résapath (ANSES) rapporte effectivement des pourcentages de résistance non négligeables de germes issus de mammites (bovins, ovins, caprins) vis à vis de plusieurs classes d'antibiotiques utilisées sur le terrain (Résapath 2019). Le recours à d'autres antibiotiques, potentiellement plus efficaces dans ces cas là, tels que les fluoroquinolones et les céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} générations, est limité législativement par les plans Ecoantibio 1 et 2 (respectivement depuis 2012 et 2017), afin d'éviter l'apparition d'autres antibiorésistances qui seraient, à terme, à risque pour la santé humaine. La baisse d'efficacité et la restriction d'usage de certaines substances antibactériennes limitent donc

considérablement la prise en charge thérapeutique des infections intra-mammaires (IIM) dans les élevages, où les mesures de prévention des mammites se développent de plus en plus. Outre les bonnes pratiques d'élevage en termes d'hygiène et de conduite de troupeau, les caractéristiques génétiques des animaux sont aujourd'hui un levier d'action pour la gestion des IIM, que ces dernières soient cliniques ou subcliniques. En effet, depuis plusieurs années, la santé de la mamelle et la résistance aux mammites sont considérées comme des caractères d'intérêt lors de la sélection de races laitières, et sont intégrées dans le calcul des index génétiques des reproducteurs utilisés dans ces races. Aujourd'hui, l'enjeu est d'affiner la caractérisation génétique des reproducteurs potentiels, en utilisant notamment la sélection génomique, basée sur la lecture du génome d'un individu dans le but d'en évaluer la valeur génétique. Pour cela, il est nécessaire de mieux comprendre le support génétique de la résistance aux mammites, ce qui passe par la caractérisation du rôle de certains gènes potentiellement impliqués dans l'immunité mammaire chez les ruminants, comme *Socs2*.

Le premier chapitre de cette thèse traite de la question des mammites chez les brebis laitières, notamment en France, en s'appuyant sur des données bibliographiques. Dans un premier temps, leurs principales caractéristiques épidémiologiques, cliniques et diagnostiques sont abordées. Dans un second temps, les mécanismes immunitaires en jeu lors d'une IIM sont décrits en partie, afin de mieux comprendre l'implication d'une protéine comme SOCS-2 lors de mammite. Enfin, la question des traitements et de la prévention des mammites est abordée au niveau de l'élevage et à l'échelle nationale, en présentant en particulier les schémas de sélection des races ovines laitières françaises.

Le second chapitre s'intéresse à l'impact d'une mutation ponctuelle du gène *Socs2* sur la santé de la mamelle lors d'une IIM expérimentale, menée sur deux groupes de brebis dont le génotype *Socs2* diverge. L'infection mammaire est d'abord étudiée en analysant la réponse immunitaire dans les hémis-mamelles inoculée et non inoculée, puis les deux groupes de brebis de génotype différent sont comparés afin de tirer d'éventuelles conclusions sur le rôle de la protéine SOCS-2 au sein de l'immunité mammaire. Ces analyses sont menées à l'échelle de la mamelle, à partir de données cliniques, lésionnelles, biologiques et bactériologiques. À l'issue de cette étude, nous discuterons nos résultats et des effets de la mutation de SOCS-2 sur la réponse immunitaire aux IIM mis en évidence lors de ces travaux.

Chapitre 1 : Étude bibliographique

Les mammites sont définies comme des inflammations de la glande mammaire, essentiellement causées par des IIM par des bactéries de divers genres. Chez les ruminants, elles peuvent être cliniques et provoquer l'apparition de symptômes pouvant aller jusqu'à une altération marquée de l'état général voire la mort, ou bien n'être que subcliniques. Elles sont alors caractérisées par des modifications du lait, non détectables par l'observateur averti ; elles nécessitent le recours à des examens complémentaires. Les facteurs favorisant les mammites peuvent varier selon les espèces en raison de différences physiologiques et de la conduite d'élevage (Bergonier et al. 2003) ; nous ne parlerons ici que des caractéristiques des mammites qui affectent les races ovines, en particulier celles destinées à la production de lait.

Trois principaux bassins rassemblent l'essentiel de la production laitière ovine en France : le bassin de Roquefort en Aveyron (170 millions de litres de lait produits en 2017), les Pyrénées Atlantiques (63,6 millions de litres) et la Corse (6,8 millions de litres) (IDELE, CNE 2018). La majeure partie du lait produit est transformée en fromages, dont certains sont fabriqués à partir du lait cru (Bergonier et al. 1997). Plusieurs appellations d'origine protégées (AOP) existent sur le territoire (Roquefort en Aveyron, Ossau-Iraty dans les Pyrénées Atlantiques), chacune ayant des exigences quant à la qualité du lait.

Ces contraintes de la filière en termes de qualité du lait se répercutent à l'échelle de l'exploitation et expliquent en partie l'impact économique que les mammites peuvent avoir.

De plus, selon leur sévérité, les mammites peuvent engendrer :

- de la mortalité chez les brebis atteintes de formes suraiguës à aiguës (Menzies et Ramanoon 2001),
- des lésions mammaires irréversibles, même après guérison, pouvant réduire la sécrétion lactée et conduire à de la mortalité néonatale ou à un retard de croissance des agneaux par sous-alimentation lors des lactations suivantes (Fthenakis et Jones 1990; Arsenault et al. 2008),
- des frais vétérinaires pour le traitement ou la prévention des mammites,
- un manque à gagner en cas de réforme précoce et non-volontaire de la brebis (Astruc 2017).

Le contrôle des mammites à l'échelle du troupeau constitue ainsi un enjeu majeur pour les producteurs de lait de brebis. Pour cela, des actions complémentaires pourront être menées à différents niveaux, tant à l'échelle de l'élevage (pratiques médicales, traite, etc.) qu'à l'échelle nationale en incluant des critères de santé mammaire dans les programmes de sélection génétique des races d'intérêt.

Ce chapitre comprend trois parties. La première traite des causes et de la mise en évidence des mammites chez la brebis (étiologie et diagnostic). La deuxième décrit la pathogénie et les mécanismes immunologiques développés à la suite d'une IIM, et la troisième fait un état des lieux des facteurs de risque et des moyens de prévention des mammites, en détaillant plus particulièrement les modèles de sélection des brebis laitières ayant cours aujourd'hui en France.

1. Origine et détection des mammites chez la brebis

1.1. Étiologie

Chez les ovins, les IIM bactériennes prédominent largement, bien qu'il existe des mammites d'origine lentivirale (virus Maëdi-Visna, MVV) (Menzies et Ramanoon 2001), ou fongique (*Aspergillus fumigatus*, *Candida*) (Bergonier et al. 1997; Menzies et Ramanoon 2001). L'infection mammaire résulte de la contamination de la mamelle par un micro-organisme pathogène par passage rétrograde dans le canal du trayon, sauf pour des infections générales à tropisme mammaire comme les lentiviroses ou les mycoplasmoses (Bergonier et al. 1997).

Les **mammites cliniques** (avec modification macroscopique du lait et/ou symptômes locaux et/ou généraux) sont le plus souvent dues à *Staphylococcus aureus* ou des staphylocoques coagulase négatifs SCN (*S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. xylosus*, etc.) (Saratsis et al. 1998; Bergonier et Berthelot 2003; Bergonier et al. 2003; Mørk et al. 2007). D'autres agents pathogènes peuvent occasionnellement intervenir comme des Streptocoques (*S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*) - en particulier dans les cas d'allure épizootique (Bergonier et al. 1997; 2003), des Entérocoques, divers Coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*), *Mannheimia haemolytica* (Omaleki et al. 2011), ainsi que d'autres germes opportunistes comme *Trueperella pyogenes* ou *Clostridium perfringens*, etc. (Saratsis et al. 1998; Bergonier et al. 2003; Mørk et al. 2007). *Mycoplasma agalactiae*, agent de l'agalactie contagieuse est responsable de mammites associées ou non à des arthrites ou une conjonctivite (Bergonier et Poumarat 1996).

Les **mammites subcliniques** (avec des modifications microscopiques du lait, dont l'augmentation de la concentration des cellules somatiques du lait) sont principalement dues à des SCN (Bergonier et al. 2003; Mørk et al. 2007), suivis par *S. aureus* et des Streptocoques (Watkins, Burriel, et Jones 1991). Plus rarement, des Coliformes, Entérocoques et Corynébactéries ont été isolés (Bergonier et Berthelot 2003).

Le principal réservoir des Staphylocoques et de certains Streptocoques sont les mamelles infectées et les lésions de la peau des trayons, qui constituent des sources importantes et durables de bactéries (**Tableau 1**). Toutefois, ces bactéries sont aussi présentes dans le microbiote cutané des animaux sains. La machine à traire peut aussi être vectrice de contamination de la mamelle en cas d'accumulation de ces bactéries dans les manchons trayeurs et le lactoduc. Chez la brebis, contrairement à la vache, le réservoir environnemental

(litière, bâtiment) est une source mineure de bactéries susceptibles de provoquer des mammites (Entérobactéries, Entérocoques, etc.). Enfin, certaines bactéries ont un réservoir mixte et peuvent être isolées à la fois du tégument des animaux et de l'environnement ; c'est le cas de *Streptococcus uberis* (Bergonier et al. 1997). On notera la particularité de *Mannheimia haemolytica* qui provient essentiellement de la sphère naso-pharyngée des agneaux qui la transmettent à leur mère lors de la tétée (Omaleki et al. 2011).

Tableau 1: Réservoir principal et fréquence relative des bactéries responsables de mammites cliniques et subcliniques chez les brebis (d'après Bergonier et Poumarat 1996, Bergonier et al. 1997, Saratsis et al. 1998, Menzies et Ramanoon, 2001, Bergonier et Berthelot 2002, Bergonier et al. 2003, Mork et al. 2007)

Bactéries	Réservoir principal	Mammites cliniques	Mammites subcliniques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Mammaire	+++	++
Staphylocoques à coagulase négative*	Mammaire	++	+++
<i>Streptococcus uberis</i>	Environnement	+	+
<i>Streptococcus dysgalactiae / agalactiae</i>	Mammaire	+	++
Coliformes**	Environnement	-	-
<i>Mannheimia haemolytica</i>	Nasopharynx des agneaux	-	-
<i>Mycoplasma agalactiae</i>	Mamelle, sécrétions diverses	+/-	-
Autres***		--	--

* *Staphylococcus epidermidis*, *S. simulans*, *S. xylosus*, etc.

** *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp*, etc.

*** *Trueperella pyogenes*, *Clostridium perfringens*, *Pasteurella spp*, *Listeria monocytogenes*, etc.

Ces réservoirs expliquent en grande partie la répartition dans le temps des différents types de mammites, selon le stade de lactation (**Figure 1**). Par exemple, les mammites causées par les Staphylocoques, dont le réservoir est mammaire, surviennent essentiellement au début de la traite. Les mammites à *M. haemolytica*, transmises principalement par les agneaux, apparaissent essentiellement lors des premières semaines de la lactation, i.e. la phase d'allaitement. *Mycoplasma agalactiae* se transmettant par contact entre animaux, les cas d'agalactie contagieuse seront favorisés lorsque la densité dans le bâtiment est la plus élevée, c'est à dire pendant la phase d'allaitement, mais son caractère contagieux entraîne la présence de cas de la fin de la période sèche jusqu'à plusieurs mois de lactation. Les mammites causées par des

germes tels que *P. aeruginosa* ou *A. fumigatus*, souvent associées à un défaut d'hygiène, sont particulièrement présentes au tarissement et en période péri-partum.

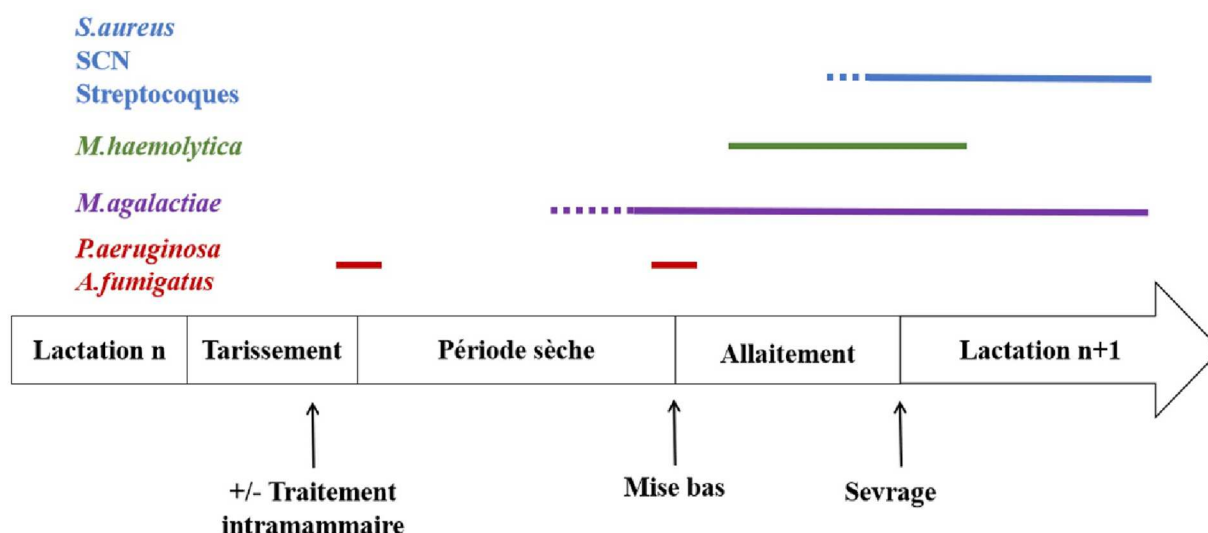


Figure 1: Principaux pathogènes impliqués dans les mammites cliniques en fonction du stade de lactation

S. aureus : *Staphylococcus aureus*, SCN : Staphylocoques à Coagulase Négative, *M. haemolytica* : *Mannheimia haemolytica*, *M. agalactiae* : *Mycoplasma agalactiae*, *P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*, *A. fumigatus* : *Aspergillus fumigatus*

1.2. Suspicion clinique

Les **mammites subcliniques** ne sont pas détectables au cours du seul examen clinique de l'animal. Souvent, l'unique marqueur de ces infections est une diminution légère de la production laitière (Giadinis et al. 2012).

La mise en évidence de **mammites cliniques** repose sur la détection des signes d'inflammation locale ou d'infection mammaires, associées ou non à des signes généraux. En général, la prévalence des mammites cliniques chez la brebis laitière ne dépasse pas 5 % du troupeau, bien qu'il puisse y avoir des situations à allure épizootique avec jusqu'à 50 % de brebis atteintes (Bergonier et al. 1997).

La modification macroscopique du lait constitue un marqueur précoce pour la détection des mammites cliniques, bien que l'intensité des signes dépende beaucoup de la sévérité et de l'avancement de la maladie. La sécrétion lactée peut présenter des anomalies de consistance (présence de caillots de fibrine ou « grumeaux », présence de pus, etc.) ou de couleur (présence de sang dans le lait, sécrétion séreuse translucide avec perte du caractère lacté, etc.) (Menzies et Ramanoon 2001). Elles peuvent être détectées par l'éleveur par examen des premiers jets avant chaque traite, en cas de suspicion essentiellement. Comme pour les mammites subcliniques, les IIM cliniques sont associées à une chute de la production laitière.

L'examen visuel et la palpation de la glande mammaire permettent la détection des signes d'inflammation consécutifs à l'infection. L'hémi-mamelle infectée peut être douloureuse, de volume augmenté (**Figure 2a**), ou anormalement chaude à la palpation. Sa couleur peut évoluer vers le rouge voire le violet-noir en cas de nécrose lors de mammite gangreneuse (causées par *S. aureus* ou *P. aeruginosa* dans la plupart des cas) (Menziés et Ramanoon 2001). La mamelle est alors froide à la palpation et un sillon disjoncteur délimite la partie nécrosée de la partie saine (**Figure 2b**). Dans les formes plus chroniques, la mamelle peut être indurée consécutivement à la fibrose cicatricielle de la glande ou présenter des abcès multifocaux plus ou moins palpables, en fonction de leur taille qui est variable (*S. aureus*) et de leur localisation plus ou moins superficielle. L'hypertrophie et l'induration des nœuds lymphatiques mammaires sont également un signe de mammite.



Figure 2 : Profils de mamelles anormaux

(a) hémi-mamelle gauche hypertrophiée (*Mycoplasma agalactiae*) ;

(b) mammite gangréneuse à droite : nécrose cutanée sévère avec sillon disjoncteur (flèche), recherche de l'agent étiologique non effectuée

Crédits photos : Service de pathologie des ruminants, ENVT.

Dans les cas les plus sévères, les signes cliniques mammaires s'accompagnent de symptômes généraux. La brebis présente alors une hyperthermie, un abattement associé à une dysorexie (Bergonier et al. 1997; Mørk et al. 2007). Une boiterie peut apparaître en cas de douleur mammaire sévère (Menziés et Ramanoon 2001). Dans 30 à 40 % des cas, les mammites suraiguës les plus graves engendrent une bactériémie ou un sepsis (Menziés et

Ramanoon 2001). Elles sont alors associées à un état fébrile rapidement suivi d'une hypothermie, un coma, et mènent à terme à la mort de l'animal si elles ne sont pas prises en charge précocement.

À plus long terme, une mammites non létale et non traitée pourra évoluer vers la guérison bactériologique spontanée (absence de micro-organismes), ou devenir chronique si l'infection mammaire se maintient à bas bruit. Il peut alors y avoir une guérison clinique provisoire, mais souvent suivie de une ou plusieurs récurrences. Le plus souvent, ces mammites chroniques engendrent une altération de la qualité du lait, comme dans les cas de mammites subcliniques.

1.3. Détection des infections intra-mammaires

1.3.1. Diagnostic direct

L'examen bactériologique du lait lors de mammites permet de mettre en place des mesures de contrôle spécifiques à un agent étiologique donné. En vue de cette analyse, le lait doit être prélevé dans des conditions stériles (élimination des premiers jets, désinfection du trayon, support de prélèvement stérile, pas de contact entre le récipient et le trayon) afin de d'éviter la contamination de l'échantillon par des agents opportunistes extérieurs (Fragkou, Boscov, et Fthenakis 2014). Il existe plusieurs techniques de culture et d'identification des bactéries.

Culture conventionnelle

La culture bactérienne conventionnelle consiste à mettre en culture des échantillons de lait dans un milieu contrôlé. Différents milieux de culture plus ou moins sélectifs peuvent être utilisés selon les germes attendus. Des tests pour identifier la bactérie obtenue par culture sont ensuite réalisés pour permettre l'identification. Isoler une bactérie en culture pure (seules des colonies de cette bactérie se sont développées) et avec un nombre de colonies supérieur à trois suffit à démontrer l'imputabilité de cet agent pathogène sur le développement de la mammites. La culture pourra être répétée pour suivre l'évolution de l'infection ou pour évaluer l'efficacité du traitement mis en place. Cette technique présente néanmoins certains inconvénients, notamment la durée nécessaire à l'obtention des résultats (de 48 à 72h) (Rovai et al. 2014) et la nécessité d'équipements de laboratoire, qui rendent son utilisation sur le terrain contraignante. C'est pourquoi ce type d'analyse est rarement employé en pratique pour les cas de mammites sporadiques. Elle peut être envisagée en cas d'épizootie afin d'identifier

le germe en cause et d'adapter les mesures de lutte en conséquence (Bergonier et Berthelot 2003). Considérée comme le test de référence pour le diagnostic des mammites (Contreras et al. 2007; Fragkou, Boscós, et Fthenakis 2014), la culture bactériologique conventionnelle présente des limites. Tout d'abord, lors de mammites, l'inflammation mammaire, bien que causée par l'IIM, peut persister après l'élimination de la bactérie (Albenzio et al. 2002). En outre, l'absence de croissance bactérienne peut se produire si le milieu de culture choisi n'est pas adapté à la croissance du micro-organisme présent, en présence de substances inhibitrices dans le lait (ex : lactoferrine, lysozyme, etc.) ou en cas de concentration bactérienne trop faible ou intermittente dans l'échantillon de lait analysé, comme lors de mammites subcliniques par exemple (Albenzio et al. 2002; Arsenault et al. 2008; Taponen et al. 2009).

Analyses par PCR

Des analyses bactériologiques par PCR (Polymerase Chain Reaction) ont également été développées pour rechercher les agents étiologiques des mammites. Cette technique repose sur l'amplification spécifique de fragments de l'ADN du micro-organisme recherché, afin de les rendre détectables. Les analyses bactériologiques par PCR sont plus rapides que la culture conventionnelle (3-4h), mais souvent plus onéreuses et contraignantes d'un point de vue matériel. Un des atouts majeurs de la PCR est sa capacité à déterminer l'agent étiologique en cause dans 50 % des mammites où la culture conventionnelle n'avait pas été concluante (Taponen et al. 2009).

1.3.2. Diagnostic indirect

Comptages des cellules somatiques

Les cellules dans le lait

Le comptage des cellules somatiques est une méthode de quantification des cellules présentes dans le lait (Souza et al. 2012). On y retrouve différents types de leucocytes en quantité variable. Chez la brebis, en l'absence d'IIM, la sous-population leucocytaire prédominante est celle des macrophages (45-88 %), suivie par celle des granulocytes neutrophiles (2-40 %), celle des lymphocytes (6-20 %), et d'autres populations plus marginales (granulocytes éosinophiles, autres cellules non leucocytaires dont des cellules épithéliales, etc.) (Menzies et Ramanon 2001; Paape et al. 2001; Bergonier et al. 2003).

Une variation de la concentration des cellules somatiques (CCS) peut être physiologique. En effet, les CCS augmentent généralement avec l'avancement de la lactation,

la parité, le nombre d'agneaux, les pratiques de traite (type, fréquence, équipement, etc.) et divers facteurs d'élevage (Bergonier et al. 2003; Bergonier et Berthelot 2003; Paape et al. 2007; Souza et al. 2012). La formule leucocytaire varie également : la proportion de macrophages et de neutrophiles augmente au cours de la lactation, tandis que celle des lymphocytes et des cellules épithéliales diminue (Cuccuru et al. 1997). Néanmoins, les variations de CCS en l'absence de mammites, de l'ordre de 40 000 à 100 000 cel/mL, restent minimales en comparaison de celles mesurées lors d'une IIM (Leitner et al. 2001; Bergonier et al. 2003; Paape et al. 2007).

Les cellules lors d'infection intra-mammaire

Chez les ruminants, en cas de contamination de la mamelle par un agent pathogène, les cellules immunitaires résidentes et les cellules épithéliales mammaires initient la réponse immunitaire. Il en résulte un recrutement de leucocytes à partir du compartiment sanguin qui agissent contre les bactéries au sein du tissu mammaire (Paape et al. 2002; Rainard et Riollot 2003). Cela a pour conséquence l'augmentation de la CCS, qui constitue donc un marqueur utile pour le diagnostic des mammites, notamment subcliniques (Bergonier et Berthelot 2003; Albenzio et al. 2012; Souza et al. 2012; Fragkou, Boscós, et Fthenakis 2014). En présence d'IIM (origine principalement bactérienne), les neutrophiles sont la sous-population leucocytaire la plus représentée dans le lait (représentent environ 70-90 % des cellules lorsque les CCS dépassent 400 000 cel/mL) (Cuccuru et al. 1997). L'intensité de l'augmentation des CCS lors d'IIM varie selon l'agent pathogène en cause (Bergonier et Berthelot 2003; Gonzalo et al. 2002). Chez la brebis laitière, un classement des agents pathogènes selon l'augmentation de CCS qu'ils entraînent a été proposé (Gonzalo et al. 2002). Cependant, les variations de CCS possibles pour une même espèce donnée sont telles qu'il n'est pas possible d'établir une distinction stricte entre pathogènes majeurs et secondaires (Bergonier et Berthelot 2003). Chez la chèvre, il a aussi été mis en évidence une variation de la formule leucocytaire dans le lait en fonction de l'agent causal : la proportion de neutrophiles dans le lait était plus élevée lors d'IIM à *S. aureus* ($95,1 \pm 3,4$ %) que lors de mammites à *S. epidermidis* ($64,7 \pm 3$ %) (Leitner et al. 2011).

Les techniques de comptage des cellules

Chez les petits ruminants contrairement aux bovins, des particules cytoplasmiques de même taille que les cellules mais ne contenant pas d'ADN sont aussi émises par excrétion apocrine des cellules du tissu mammaire. L'excrétion moyenne de ces particules atteint 15 000

particules/mL chez les brebis (Paape et al. 2001). Certaines techniques de comptage manquent de spécificité pour discriminer cellules et particules cytoplasmiques. C'est le cas de la microscopie directe par coloration au bleu de méthylène, considérée comme la méthode de référence par l'International Dairy Federation (IDF 1995 : 148A). Toutefois, l'utilisation de cette méthode pour déterminer les CCS du lait de brebis reste valide pour le lait de brebis malgré des teneurs en particules cytoplasmiques jusqu'à 95 000/mL (Gonzalo et al. 2003). De nos jours, la majorité des laboratoires sont équipés d'automates utilisant la méthode fluoro- opto-électronique. Elle est basée sur la détection de la fluorescence des cellules du lait, après exposition à un agent fluorescent se fixant à l'ADN. Avec cette technique, les particules cytoplasmiques ne sont donc pas recensées ; c'est pourquoi elle est adéquate pour mesurer la CCS dans le lait de petits ruminants (Souza et al. 2012). Néanmoins, des précautions en terme de conservation des prélèvements (réfrigération notamment) sont à considérer pour s'assurer de la validité des résultats (Gonzalo et al. 2003).

L'interprétation des résultats du comptage cellulaire

Les modalités d'interprétation des CCS sont d'une importance capitale car c'est sur elles que repose la prise de décision raisonnée pour la lutte contre les mammites (choix des animaux à réformer, traitement au tarissement, etc.) (Gonzalo et al. 2002; Bergonier et Berthelot 2003; Souza et al. 2012).

Pour discriminer les héli-mamelles saines de celles qui sont infectées, certaines études proposent des seuils appliqués à une mesure de CCS individuelle unique. Ces seuils varient de 200 000 cel/mL à 1 000 000 cel/mL, mais la plupart sont inférieurs à 500 000 cel/mL (Gonzalo et Gaudioso 1985; Bergonier et al. 1997; Bergonier et Berthelot 2003; Berthelot et al. 2006; Souza et al. 2012). Une deuxième façon d'interpréter les CCS individuelles repose sur la confrontation de plusieurs mesures mensuelles consécutives. Une étude menée dans le sud-ouest de la France a établi une règle de décision qui catégorise les mamelles en trois classes – saine, douteuse, infectée. Une mamelle est décrétée saine si aucune CCS mensuelle ne dépasse 500 000 cellules/mL et infectée si au moins 2 CCS mensuelles dépassent 1 000 000 cellules/mL. Dans les autres cas, la mamelle est considérée de statut douteux (Berthelot et al. 2006). Il semblerait que la dernière méthode soit la plus efficace car elle prend en compte l'évolution de la santé mammaire dans le temps de façon plus représentative qu'une CCS ponctuelle. Néanmoins, la mesure des CCS individuelles n'est pas réalisée systématiquement en pratique ; il est donc parfois difficile d'appliquer ces règles dans les élevages.

Les CCS mesurées sur le lait de tank permettent d'estimer la prévalence globale des mammites subcliniques dans le troupeau. Une moyenne géométrique des CCS de tank mensuelles sur un an égale à 650 000 cel/mL correspond à une prévalence de mammites subcliniques d'environ 15 %. Une variation de 100 000 cel/mL correspond à 2 à 3 % de variation de prévalence (Berthelot et al. 2006).

California Mastitis Test

Le California Mastitis Test (CMT) permet une évaluation semi-quantitative des cellules somatiques dans le lait par évaluation de l'intensité de floculation du lait au contact d'un détergent. L'interprétation se fait par notation de l'intensité de la réaction sur une échelle de 1 à 5 niveaux (-/± /+/++/+++).

Ce test est assez bien corrélé aux résultats de CCS compte tenu de son caractère subjectif, bien que les coefficients de corrélation varient entre 0,51 et 0,82 selon les études (Gonzalez-Rodriguez et Carmenes 1996; Menzies et Ramanoon 2001). Des résultats de CMT – ou ± correspondent à des valeurs de CCS inférieures à 250 000 cel./mL, les notes les plus élevées (++ à +++) correspondent à des valeurs de CCS comprises entre 500 000 et plus de 900 000 cel./mL (Bergonier et Berthelot 2003). La principale difficulté de ce test réside dans l'interprétation du résultat. Afin de faciliter la notation, il a été proposé de raisonner sur une échelle de 3 niveaux, en comparant les deux hémi-mamelles à chaque fois et en renouvelant le test pour avoir une idée globale de la santé mammaire (Bergonier et al. 1997; Souza et al. 2012).

Il s'agit d'un test facile à mettre en œuvre par l'éleveur et peu onéreux comparativement aux CCS individuelles, difficiles à évaluer mensuellement chez les petits ruminants pour des raisons financières. Le CMT constitue donc un bon substitut aux CCS sur le terrain (Bergonier et al. 1997), notamment comme une première évaluation de la santé mammaire afin de sélectionner les hémi-mamelles les plus pertinentes à analyser de façon plus poussée, à l'aide d'un examen bactériologique par exemple (Menzies et Ramanoon 2001; Arsenault et al. 2008).

2. Pathogénie de l'infection et réponse inflammatoire

2.1. Structure et défenses physico-chimiques de la mamelle

2.1.1. *Structure anatomique et histologique de la mamelle de la brebis*

La brebis possède une paire de glandes mammaires inguinales, de forme globuleuse. Dans les conditions physiologiques, les deux héli-mamelles sont de la même taille et symétriques. Elles sont séparées par un sillon inter-mammaire profond. Les trayons sont implantés ventralement sur chaque héli-mamelle. Leur orientation crânio-latérale est accentuée par la distension de la mamelle en lactation (Labussière, Dotchewski, et Combaud 1981; Nickerson et Akers 2011).

La mamelle est entourée d'une enveloppe de peau unique. Chaque héli-mamelle est enveloppée séparément dans un tissu conjonctif fibro-élastique appelé appareil suspenseur de la mamelle. Entre les deux glandes mammaires, le ligament suspenseur médian forme une paroi de tissu conjonctif bien définie. Ce ligament maintient la mamelle attachée à la paroi abdominale ventrale et isole chaque héli-mamelle (Caja, Such, et Rovai 2004; Nickerson et Akers 2011).

Chaque glande mammaire est constituée d'un parenchyme glandulaire qui occupe la majorité de son volume (**Figure 3**). Il est parcouru de conduits lactifères qui acheminent le lait jusqu'à une zone cavitaire appelée citerne ou sinus lactifère et qui est divisée en une partie glandulaire et une partie papillaire. Le lait passe du sinus vers l'extérieur par le canal du traxon, délimité proximatement par un ensemble de replis muqueux qui constituent la rosette de Fürstenberg, et distalement par l'ostium papillaire.

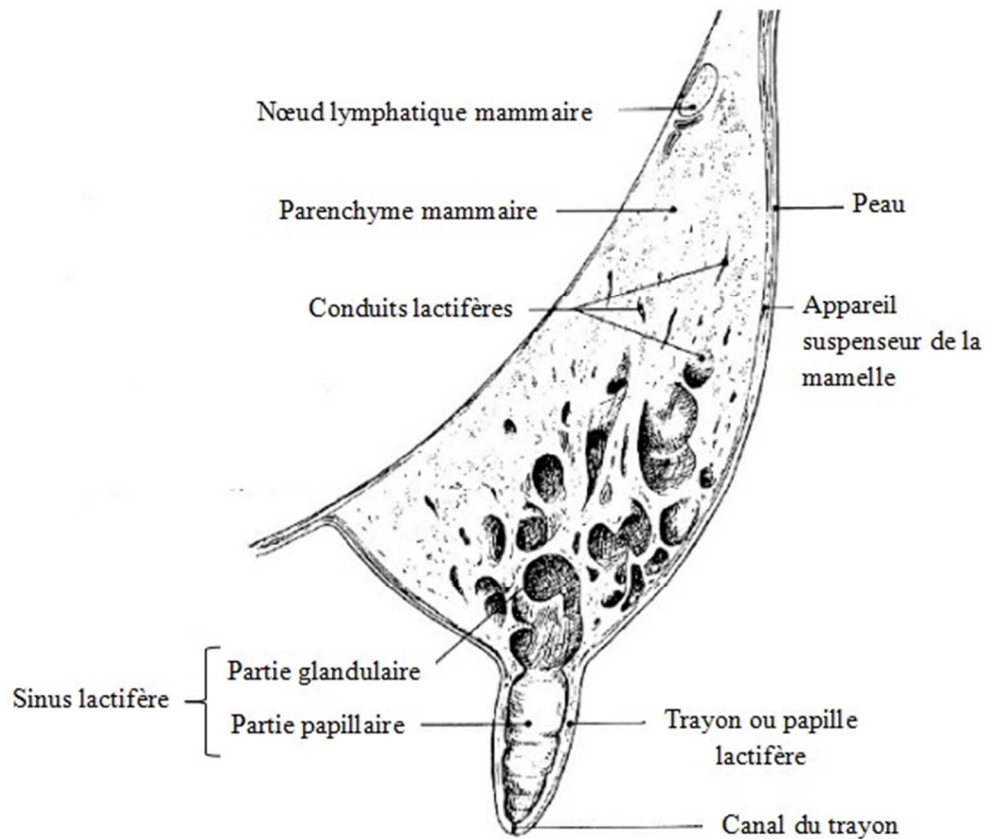


Figure 3: Coupe transversale d'une hémimamelle de brebis (d'après Barone, 1990)

La mamelle est principalement irriguée par l'artère pudendale externe, issue du tronc pudendo-épigastrique (branche de l'artère iliaque externe, elle-même issue de l'aorte abdominale). L'artère périnéale ventrale irrigue la partie caudale de la mamelle dans une moindre mesure. Le sang veineux rejoint la veine pudendale externe, puis la veine abdominale sous-cutanée pour rejoindre la veine thoracique interne et la veine cave crâniale. La mamelle est également drainée par un réseau lymphatique rejoignant les nœuds lymphatiques inguinaux superficiels, aussi appelés nœuds lymphatiques mammaires (Nickerson et Akers 2011; Fails et Magee 2018).

D'un point de vue histologique, la mamelle est une glande composée tubulo-acineuse (Eurell et Frappier 2006; Aughey et Frye 2001). Les alvéoles, de forme ronde à ovoïde, sont délimitées par un épithélium sécrétoire à cellules cuboïdes à cylindriques dont l'épaisseur varie beaucoup en fonction de la phase sécrétoire (**Figure 4**). En lactation, la lumière des alvéoles est large voire distendue, et plusieurs alvéoles peuvent alors fusionner. Au tarissement, la sécrétion lactée diminue, les alvéoles se rétractent partiellement et l'épithélium peut prendre un aspect irrégulier. Des cellules myoépithéliales, impliquées dans la contraction des alvéoles et l'émission du lait dans les canaux, résident entre l'épithélium sécrétoire et une lame basale.

Les alvéoles sont regroupées en lobules, eux-mêmes regroupés en lobes. Le lait produit par les cellules acineuses des alvéoles est conduit dans les canaux intra-lobulaires (épithélium simple cuboïde) puis inter-lobulaires (épithélium simple cylindrique voire double cuboïde) et par les canaux lactifères (épithélium double cylindrique) qui débouchent sur les sinus lactifères glandulaire et papillaire, lieux de stockage du lait. Des cellules musculaires lisses sont présentes en périphérie des canaux inter-lobulaires et lactifères et participent à l'excrétion du lait.

L'appareil sécrétoire est supporté par un tissu conjonctif interstitiel (**Figure 4**), dont le développement augmente en période sèche et diminue en lactation. Il est plus épais entre les lobes qu'entre les lobules. Il contient également les capillaires sanguins, lymphatiques et les nerfs qui irriguent et innervent la mamelle. Il peut contenir des cellules lympho- plasmocytaires notamment durant la période colostrale où un grand nombre d'anticorps passent dans la sécrétion lactée.

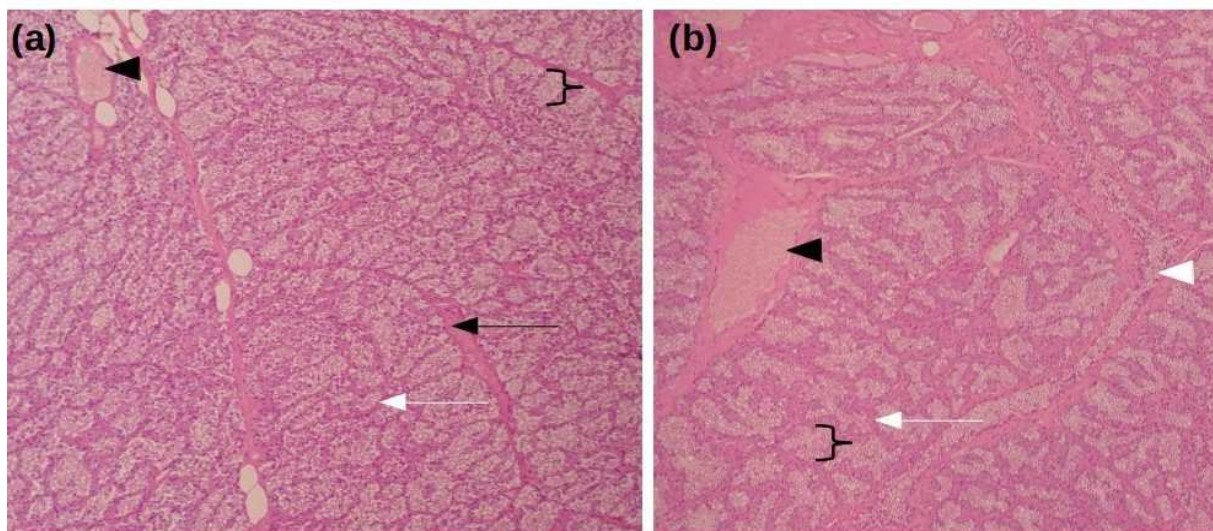


Figure 4: Coupes histologiques d'une mamelle saine

(a) Parenchyme incluant des capillaires (tête de flèche noire), un interstitium inter-lobulaire (flèche noire) et, et des alvéoles (accolade), H&E, x 40.

(b) Parenchyme incluant des capillaires (tête de flèche noire), un interstitium intra-lobulaire (flèche blanche), des alvéoles (accolade), un canal inter-lobulaire (tête de flèche blanche), H&E, x 100.

2.1.2. Défenses de la mamelle

Le canal du trayon est une structure qui protège la mamelle contre la contamination ascendante par des germes, et ce par plusieurs aspects. Tout d'abord, la muqueuse qui tapisse l'intérieur du canal est constituée de plis longitudinaux qui rendent la colonisation bactérienne difficile. De plus, la desquamation régulière de cet épithélium forme un bouchon de kératine, limitant ainsi l'entrée des agents pathogènes et la contamination de la glande mammaire par voie ascendante. Enfin, à l'extrémité du trayon, un muscle sphincter permet la fermeture du canal du trayon entre les traites ou les phases d'allaitement. (Nickerson et Akers 2011).

Le ligament suspenseur médian constitue une barrière qui s'oppose à la contamination de l'hémi-mamelle controlatérale lors d'IIM ou de traitement local. Néanmoins cette séparation ne paraît pas strictement étanche contre la diffusion de germes (Mørk et al. 2007; Nickerson et Akers 2011).

2.2. Réaction immunitaire lors d'infection intra-mammaire

2.2.1. Réponse immunitaire innée

C'est le premier type de réponse à apparaître à la suite de l'entrée d'un agent pathogène dans le réseau lactifère. Elle est précoce et rapide mais n'est pas adaptée spécifiquement à l'agent infectieux impliqué (Tizard 2009).

Initiation de la réponse immunitaire

L'initiation de la réponse immunitaire repose sur la détection des agents pathogènes par des cellules immunitaires sentinelles (macrophages, mastocytes, cellules dendritiques) présentes dans le parenchyme mammaire. Des motifs moléculaires exprimés par les bactéries, appelés **PAMPs** (Pathogen Associated Molecular Patterns) sont reconnus par des récepteurs des cellules immunitaires de l'hôte, appelés **PRR** (Pattern Recognition Receptors). Les PAMPs sont des motifs très conservés et de fait peu spécifiques d'un germe donné ; des agents très différents peuvent exprimer des PAMPs similaires qui sont reconnus par les mêmes récepteurs. Par exemple, l'acide lipotéichoïque est un PAMP présent à la surface de toutes les bactéries Gram-positives. En plus de se lier à des PAMPs, certains PRR sont également capables de reconnaître des composés issus des tissus de l'hôte lésés par l'infection, que l'on appelle **alarmines ou DAMPS** (Damage Associated Molecular Patterns). Le caractère peu spécifique de la liaison PAMPs/alarmines avec les PRR permet la précocité de détection de l'infection par le système immunitaire et une réponse rapide. Elle

enclenche un signal intracellulaire, qui aboutit à différentes réponses cellulaires. On parle de **transduction** du signal. Il existe différentes voies de transduction, mettant en jeu différents acteurs intracellulaires, qui varient selon le type de cellule et la nature du signal. De façon générique, la liaison des PAMPs avec leur PRR déclenche des réactions enzymatiques en chaîne dans le cytoplasme de la cellule, qui ont pour conséquence l'activation de la transcription de certains gènes codant diverses protéines à action inflammatoire, initiant ainsi la réponse immunitaire innée mais aussi les prémices de la réponse immunitaire acquise.

Action de composés libres

La transduction aboutit à la synthèse de composés libres à action inflammatoire.

Certains ont une action **oxydante** et sont destinés à détruire directement les agents pathogènes sur le site de l'infection.

Beaucoup d'autres sont **vasoactifs** à l'origine de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, entraînant œdème, rougeur et douleur de la mamelle. On distingue notamment les prostaglandines produites par l'enzyme COX-2 (Cyclo-Oxygenase 2) et les leucotriènes, lipides bioactifs issus de l'acide arachidonique (Williams et Morley 1973; Simon 1999). Les mastocytes libèrent de l'histamine, de la sérotonine (effet vasoactifs), ainsi que de grandes quantités d'enzymes (tryptases et chymases) qui synthétisent elles aussi des produits inflammatoires (peptides vasoactifs) et stimulent la réparation tissulaire. Les neutrophiles libèrent des composés favorisant leur adhérence à la surface de l'endothélium vasculaire, facilitant leur passage dans les tissus.

Enfin, la transduction des signaux cellulaires aboutit aussi à la synthèse de **cytokines inflammatoires** qui sont des messagers chimiques impliqués dans la régulation positive et négative de la réaction immunitaire (Paape et al. 2007). Une même cytokine peut avoir différents effets selon le récepteur auquel elle se lie (phénomène de pléiotropie), et un même récepteur peut se lier à différentes cytokines (phénomène de redondance). Elles peuvent avoir une action paracrine, autocrine ou même endocrine. Par transduction du signal, elles entraînent une réponse cellulaire destinée à lutter contre l'infection et qui dépendra de la cellule cible. On distingue plusieurs types de cytokines. Parmi les principales se trouvent le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) qui joue un rôle dans le recrutement des leucocytes et active plusieurs enzymes impliquées dans l'inflammation, l'IL-1 (interleukine-1) qui agit sur l'endothélium vasculaire pour favoriser l'adhérence des neutrophiles, et cause des symptômes systémiques en cas d'infection sévère (fièvre, myalgie, dysorexie, etc.) ou encore l'IL-6 (interleukine-6) qui est un facteur essentiel de la phase aiguë de l'inflammation.

On distingue aussi les **chimiokines**, une famille de petites cytokines chimiotactiques dont le rôle principal est le contrôle de la migration et du positionnement des leucocytes dans le site infecté.

L'ensemble des actions engendrées par ces composés cause une fuite massive de plasma des vaisseaux sanguins vers le tissu mammaire, ce qui active la coagulation sanguine. L'agrégation plaquettaire accélère le processus. La thrombine, molécule largement libérée par l'activation de la coagulation, agit sur le fibrinogène pour produire de la fibrine non soluble. Organisée en filaments, elle se dépose dans le parenchyme mammaire et forme une barrière physique limitant la propagation des bactéries. Selon l'intensité des ces dépôts, elle pourra se retrouver dans le lait et altérer son aspect.

Action des cellules recrutées par chimiotactisme

Les principales cellules actives de l'immunité innée sont regroupées sous le nom de phagocytes, mot qui désigne leur capacité à internaliser les bactéries avec lesquelles elles sont en contact pour les neutraliser et les éliminer.

Chez les ruminants, les **granulocytes neutrophiles** (ou neutrophiles) ne représentent que 20 à 30 % des leucocytes sanguins. Néanmoins, c'est le type leucocytaire le plus impliqué dans la réponse immunitaire innée lors d'infection par des bactéries, notamment si elles sont pyogènes, comme *Staphylococcus aureus*. Les neutrophiles sont des cellules de 10 à 20 µm de diamètre, à noyau polylobé, possédant des granulations cytoplasmiques qui contiennent des protéines telles que le lysozyme ou la lactoferrine. Les neutrophiles sont attirés sur les lieux de l'infection par des chimiokines comme CXCL2 et d'autres cytokines comme IL-1, IL-2, IL-8, ou encore le composé C5a du système du complément (mélange complexe d'enzymes, de protéines régulatrices et de récepteurs qui joue un rôle majeur dans l'immunité innée) (Paape et al. 2002). Par ailleurs, des agents fibrinolytiques dégradent la fibrine en composés chimiotactiques pour les neutrophiles, ce qui permet l'entretien du signal d'attraction.

Ces molécules attractives se fixent spécifiquement aux neutrophiles et les activent. Il s'en suit l'adhérence du neutrophile à l'endothélium vasculaire par l'intermédiaire de différentes protéines exprimées à sa surface. Dans un premier temps, le neutrophile est ralenti et « roule » sur l'endothélium vasculaire en établissant des liaisons de faible intensité mettant en jeu des sélectines. Ensuite, il adhère définitivement aux cellules endothéliales lorsque ses intégrines se lient à leurs récepteurs. Sous l'influence des composés chimiotactiques, le neutrophile émigre ensuite vers les tissus environnants en s'immiscant entre les cellules endothéliales. Ce processus est appelé diapédèse ou transmigration (**Figure 5**).

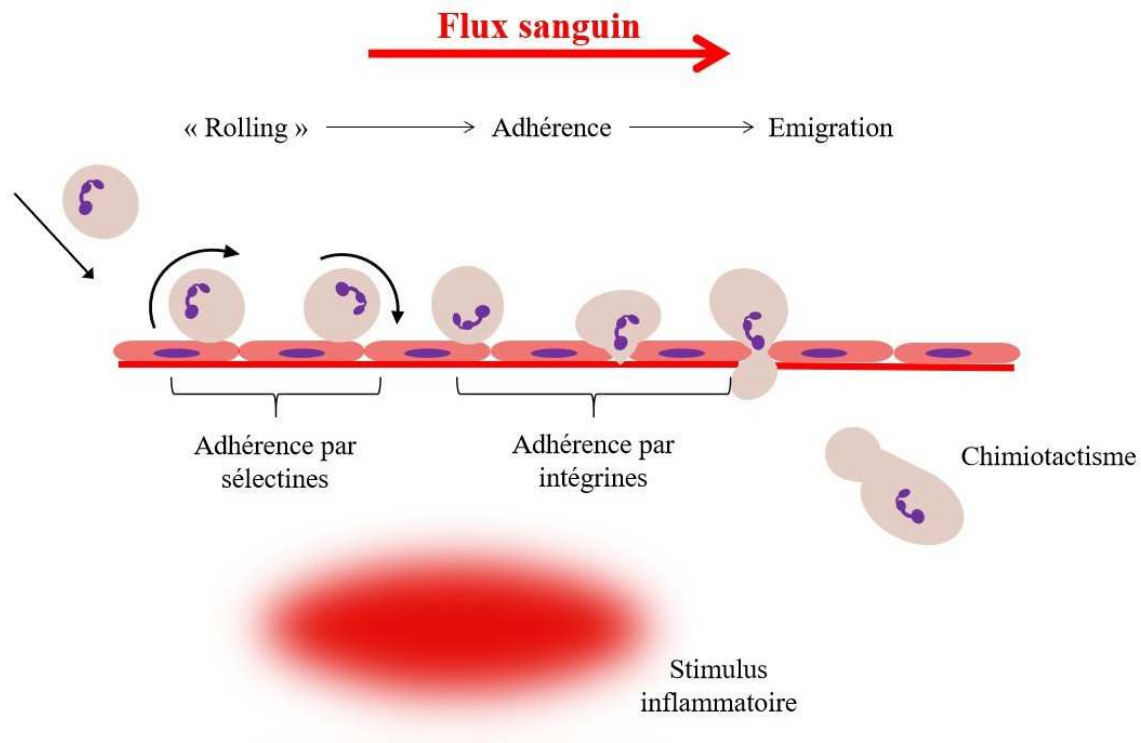


Figure 5: Étapes du recrutement des neutrophiles au site de l'inflammation : attraction par chimiotactisme, adhérence à l'endothélium vasculaire et diapédèse des neutrophiles (d'après Tizard, 2009)

L'adhérence et la diapédèse des neutrophiles dépendent donc entièrement l'action préalable des composés libérés lors de l'initiation de la réponse immunitaire (décrits précédemment), qui ont engendré entre autres l'expression des molécules d'adhésion à la surface des neutrophiles et des cellules endothéliales.

Une fois sur le site de l'inflammation, les neutrophiles se lient aux bactéries pour les internaliser et les détruire : c'est le processus de **phagocytose (Figure 6)**.

La première étape est l'adhésion de la bactérie au neutrophile. Elle peut se faire soit directement entre le neutrophile et la bactérie, soit indirectement, par l'intermédiaire de molécules appelées opsonines, qui facilitent le phénomène de phagocytose. Les opsonines sont de nature et d'origine variées. Parmi les plus importantes se trouvent certaines molécules issues de la réponse immunitaire innée comme des composés du complément, et d'autres issues de l'immunité acquise, c'est le cas des anticorps. Les opsonines se lient à certains motifs antigéniques présents sur la bactérie, et seront reconnues par les neutrophiles. Ainsi, elles augmentent l'affinité globale de la liaison bactérie-phagocyte.

Une fois reconnue et liée au neutrophile, la bactérie est internalisée et se retrouve emprisonnée dans une vésicule entourée d'une membrane, appelée phagosome.

Plusieurs voies de destruction de la bactérie coexistent. La première repose sur la synthèse d'agents oxydants par l'enzyme NOX, dont l'expression dans la membrane du phagosome a été activée par le signal cytokinique (TNF α). On parle de stress oxydatif. Sous forme de radicaux libres, ces composés entraînent la formation de peroxyde d'hydrogène qui, par réaction avec différents ions dont Cl⁻, détruit la bactérie en oxydant ses lipides et protéines. Les agents oxydants favorisent aussi l'action des molécules antimicrobiennes qui constituent la seconde voie de destruction des bactéries par les neutrophiles. Dès la reconnaissance de la bactérie par les neutrophiles, la migration des granules cytoplasmiques vers le lieu de l'internalisation est activée. Ils fusionnent avec le phagosome pour former un phagolysosome. L'abaissement du pH dans le phagolysosome favorise le fonctionnement des molécules antimicrobiennes.

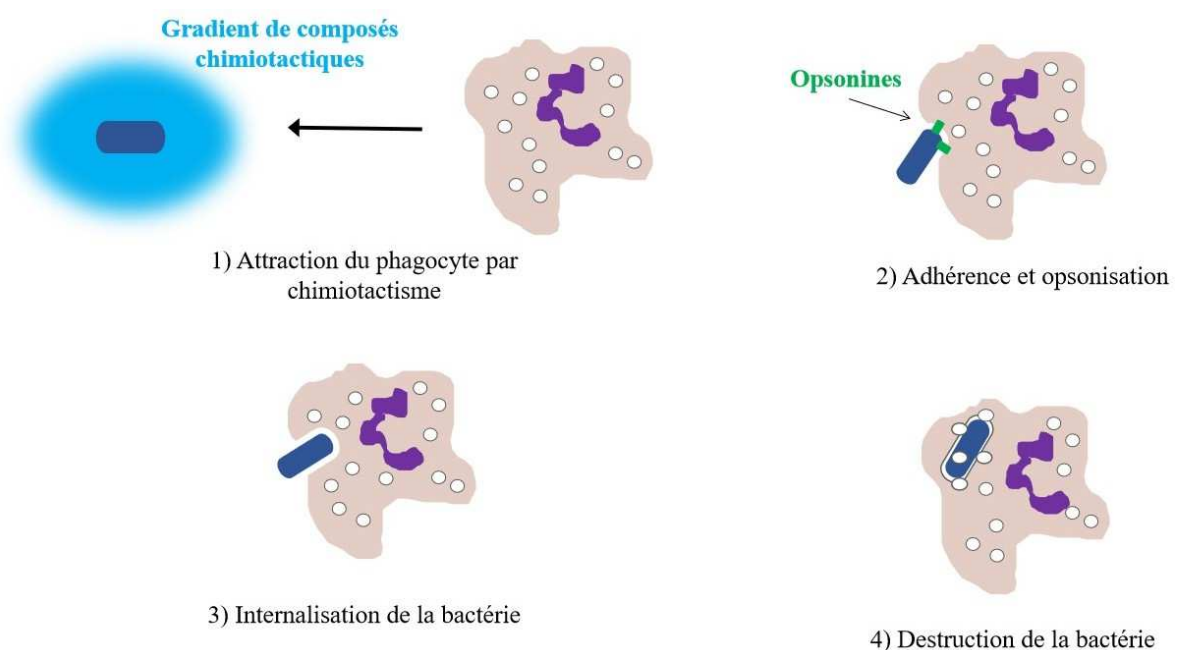


Figure 6: Étapes de la phagocytose d'une bactérie (d'après Tizard, 2009)

Plusieurs types de **molécules antimicrobiennes** existent. Des enzymes qui digèrent les parois bactériennes (élastase, cathepsine G, lysozymes, protéases, hydrolases, myéloperoxidase...) sont libérées. Les bactéries y sont plus ou moins sensibles. Certaines ne le sont pas du tout, comme *Listeria monocytogenes* qui a aussi la capacité d'interférer avec la maturation du phagosome et n'entre donc pas en contact avec elles, ce qui lui permet de se développer dans les cellules phagocytaires au contraire des autres bactéries. Les granules des neutrophiles contiennent aussi des peptides antimicrobiens qui sont capables de déstabiliser les parois et membranes bactériennes.

D'autres protéines émises comme la lactoferrine chélatent le fer, qui n'est alors plus disponible pour le métabolisme bactérien. Les lectines, protéines de la phase aiguë, ont de multiples fonctions biologiques incluant l'activation du système du complément et la stimulation des différents leucocytes. Enfin, les neutrophiles actifs synthétisent des cytokines (TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, etc.) qui vont contrôler la suite de la réaction immunitaire.

Le **macrophage** est un type cellulaire qui joue le rôle de sentinelle dans les tissus sains (cf précédemment). Toutefois, de nombreux macrophages sont aussi recrutés lors d'une infection après les neutrophiles, par des signaux cytokiniques (IL-1, IL-12, IL-23, TNF α) et protéiques (composé C5a, alarmines, etc.). Sous forme de monocytes dans le sang, ils entrent dans les tissus par diapédèse. On distingue les macrophages M1, recrutés tôt dans la réaction inflammatoire des macrophages M2, recrutés plus tardivement. Les M1 sont activés par le biais de leurs PRR et par des cytokines pro-inflammatoires dont l'IFN γ (Interféron γ). Les M2 sont activés par l'IL4, l'IL13 et l'IL10. Le rôle des M1 est de phagocyter les agents pathogènes restants, mais aussi les neutrophiles morts ou en apoptose afin de limiter la fuite d'enzymes susceptibles de léser les tissus de l'hôte. Chez certaines espèces dont les ovins, les produits bactériens induisent l'expression de l'enzyme NOS2 (Nitric Oxide Synthase 2) par les M1 qui produisent alors de l'oxyde nitrique empêchant la respiration cellulaire des bactéries. Les M1 produisent également des cytokines pro-inflammatoires. Au contraire, les macrophages M2 réduisent l'inflammation et génèrent des cytokines anti-inflammatoires. Ils promeuvent la néovascularisation et le remodelage des tissus, et sont ainsi responsables du début de la cicatrisation tissulaire.

Régulation de la réponse innée

Pour éviter l'emballement de la réaction inflammatoire, des mécanismes de régulation existent à tous les niveaux de la réponse immunitaire. Lorsque ces mécanismes de régulation sont altérés ou dépassés, un état de choc peut survenir.

Quand les neutrophiles arrivent au site de l'inflammation, ils entraînent la synthèse de prostaglandines et de leucotriènes pro-inflammatoires (cf précédemment), mais aussi des composés anti-inflammatoires. Les lipoxines sont aussi des éicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique mais leur action est anti-inflammatoire et inhibe la migration des neutrophiles. La prostaglandine E2 (PGE2) inhibent l'activité de la 5-lipooxygénase (productrice de leucotriènes). Ainsi, l'augmentation progressive de PGE2 dans les tissus oriente graduellement l'acide arachidonique vers la voie des lipoxines au détriment de celle des leucotriènes, et ainsi supprime l'inflammation à terme.

Il existe également des phénomènes de régulation négative au sein des voies de transduction intracellulaire. On peut notamment citer des molécules particulières appelées SOCS (Suppressors Of Cytokine Signaling) (Yoshimura, Naka, et Kubo 2007). Elles-mêmes induites par des cytokines, elles modulent l'intensité du signal. Par exemple, les protéines SOCS inhibent la voie de transduction JAK-STAT (Janus kinase – Signal Transducer and Activator of Transcription) en altérant la capacité enzymatique de JAK et STAT (Yoshimura et al. 2004; Croker, Kiu, et Nicholson 2008; McBerry et al. 2012; Linossi et al. 2013), stoppant ainsi la transduction du signal cytokinique pro-inflammatoire. D'autres auteurs ont montré l'implication de SOCS-2 dans la voie des lipoxines et la désactivation des protéasomes (McBerry et al. 2012).

2.2.2. Réponse immunitaire acquise

Contrairement à l'immunité innée, l'immunité acquise dite aussi adaptative repose sur la réponse spécifique à une infection par un agent pathogène. Elle est de fait plus tardive, son activation reposant sur la sélection de leucocytes efficaces possédant des récepteurs éminemment variables qui sont spécifiques de l'agent pathogène considéré.

Activation des acteurs de l'immunité acquise

Les cellules présentatrices d'antigène

Certains types cellulaires peuvent capturer et produire des fragments peptidiques bactériens, qui est l'étape préalable au déclenchement de la réponse immunitaire acquise ; on parle de cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les principales CPA sont les cellules dendritiques (CD). Immatures, elles sont distribuées dans les tissus et équipées afin de reconnaître et capturer les antigènes étrangers. Pour cela, elles expriment de grandes quantités de molécules appelés CMH (complexe majeur d'histocompatibilité). Une fois stimulées par la liaison à un antigène, les CD qui expriment à leur surface les antigènes présentés par le biais des molécules du CMH migrent vers les nœuds lymphatiques loco-régionaux par chimiotactisme, tout en devenant progressivement matures et particulièrement efficaces pour présenter ces antigènes étrangers aux lymphocytes naïfs. Pour cela, elles internalisent les antigènes, les scindent en fragments peptidiques et les présentent à leur surface en association aux molécules du CMH. La présentation des antigènes exogènes (dont l'origine est extérieure à l'organisme, comme les antigènes bactériens) se fait par le CMH de classe II, qui n'est exprimé que par certaines cellules immunitaires. Le CMH de classe I, exprimé par toutes les cellules de l'organisme, permet plutôt la présentation d'antigènes endogènes (synthétisés par

l'hôte, comme les protéines virales néoformées). Les CD expriment aussi des protéines membranaires co-stimulatrices, réduisent leur activité d'endocytose et libèrent des composés chimiotactiques qui attirent les lymphocytes naïfs.

Les macrophages ont aussi un rôle de CPA, mais ils sont moins efficaces, leur rôle principal étant la phagocytose et l'élimination des organismes étrangers et des débris cellulaires. Le pH des vésicules des CD, plus alcalin, préserve les fragments antigéniques pour les présenter à la surface de la cellule, contrairement aux macrophages. Les lymphocytes B sont un troisième type de CPA, plutôt impliqués dans la réponse immunitaire secondaire.

Formation et rôles des lymphocytes T auxiliaires

Les lymphocytes T qui s'accumulent autour des CPA se lient aux antigènes présentés via le CMH grâce à leurs récepteurs TCR (T-Cell Receptor), si et seulement si ils les reconnaissent de façon spécifique : le lymphocyte est alors activé. La sélection d'un lymphocyte n'a lieu qu'en présence de trois signaux distincts : la liaison spécifique entre le complexe peptide/CMH et le TCR, une liaison de co-stimulation impliquant d'autres composés membranaires et une stimulation cytokinique, qui va déterminer les fonctions du lymphocyte T *a posteriori*. L'interaction des lymphocytes T porteurs du marqueur CD4 avec les CD matures entraîne leur différenciation en lymphocytes T auxiliaires ou lymphocytes Th (T helper). La nature des antigènes présents impactent directement le fonctionnement des CD. Certains types d'antigènes déclenchent la sécrétion d'IL-12 par les CD qui sont alors appelées CD1 et promeuvent la différenciation des lymphocytes CD4+ en lymphocytes Th1. Les CD2 sécrètent de l'IL-1 et IL-6 et stimulent plutôt la différenciation des lymphocytes CD4+ en lymphocytes Th2. Certaines molécules microbiennes et certaines alarmines activent la synthèse d'IL23 par les CD, qui provoquent l'activation et la différenciation des lymphocytes Th17.

Les lymphocytes Th1 sécrètent IL-2 et IFN γ , stimulant ainsi la réponse adaptative cellulaire. Les lymphocytes Th2 sécrètent IL-4, IL-13 et IL-10, stimulant en général la réponse humorale. Enfin, les lymphocytes Th17 sécrètent l'IL17 et promeuvent le recrutement et l'activité des neutrophiles. Ces lymphocytes auxiliaires sont requis pour assurer une réponse immunitaire adaptée car ils participent à la différenciation et à la multiplication des effecteurs immunitaires.

Différenciation des lymphocytes B en plasmocytes

Lors d'infection, les lymphocytes B immatures sont attirés par chimiotactisme par les CPA au sein des nœuds lymphatiques. Ils possèdent des BCR (B-cell receptor) à l'aide desquels ils reconnaissent l'antigène que leur présente la CPA par le biais du CMH II. L'activation optimale des lymphocytes B requiert la liaison BCR – antigène, une liaison à un lymphocyte Th2, et une co-stimulation par les cytokines libérées par les lymphocytes Th2 (IL4, IL13, IL10). Les lymphocytes B activés deviennent soit des lymphocytes B mémoires, soit des plasmocytes sécréteurs d'anticorps.

Différenciation des lymphocytes T CD8+ en cellules effectrices

Certains lymphocytes T expriment à leur surface le marqueur CD8. Au sein des nœuds lymphatiques, ils sont attirés vers les CPA par chimiotactisme. Ils sont activés principalement en réponse à la présentation d'un antigène endogène par les CPA, par le biais du CMH I. Leur activation n'est possible que par co-stimulation par un lymphocyte Th1, qui se lie préalablement à l'antigène, induisant une augmentation de l'expression du CMH I, la sécrétion d'IL12 et de composés chimiotactiques. L'interaction suivante, entre le lymphocyte T CD8+ avec l'antigène, engendre alors sa prolifération et son activité cytotoxique.

Immunité humorale

Au cours de la réponse humorale, les plasmocytes migrent des nœuds lymphatiques où ils ont été activés vers les tissus infectés. Ils sécrètent l'équivalent soluble du BCR que l'on appelle alors anticorps ou immunoglobulines (Ig) dans le liquide interstitiel environnant. On distingue 5 classes d'Ig. Les IgG sont les immunoglobulines prédominantes dans le sérum et sont principalement impliquées dans la réponse systémique. Les IgM sont produites pendant la réponse primaire. Les IgA sont synthétisées à la surface des épithéliums, notamment digestif et respiratoire. Les IgE, en petite quantité dans le sérum, sont responsables de l'immunité contre les parasites et les allergies. Quant aux IgD, leur rôle reste mal connu.

Si des bactéries comme *S.aureus* libèrent des toxines, les anticorps les neutralisent en s'y liant et limitent ainsi leurs effets biologiques et les intoxications. Ils reconnaissent également les antigènes bactériens, et peuvent jouer le rôle d'opsonines, en contact direct avec les microbes (cf précédemment).

Tandis qu'un segment des immunoglobulines est très variable et n'est spécifique que d'un seul épitope, l'autre partie constitue un site de liaison générique, dont la forme est invariable chez un même individu. Il peut donc se lier à des récepteurs exprimés par les macrophages, qui phagocytent les bactéries ainsi marquées. Les anticorps, en interaction avec le système du complément, peuvent aussi participer directement à la destruction des microbes par activation de MACs (Membrane Attack Complexes) capables de déstabiliser les membranes bactériennes.

Immunité cellulaire

Elle est principalement développée lors d'infection virale et donc peu sollicitée lors d'infection mammaire. Brièvement, les lymphocytes T cytotoxiques activés dans les nœuds lymphatiques migrent sur le site de l'infection. Par l'intermédiaire de leurs TCR, ils reconnaissent les complexes antigènes - CMH I présentés par les cellules infectées. Ils les détruisent alors par activation des voies de l'apoptose (mort cellulaire programmée). On distingue deux voies d'apoptose : les voies intrinsèque et extrinsèque. Les lymphocytes T cytotoxiques déclenchent la voie intrinsèque par action de composés appelés perforines et granzymes, ou la voie extrinsèque par action du récepteur Fas et de son ligand. Ces deux signaux entraînent des réactions enzymatiques en cascade impliquant des capsases qui dégradent les protéines cytoplasmiques. L'ADN est fractionnée et la chromatine se condense, les organites sont détruits, puis la cellule se fragmente en plusieurs corps apoptotiques, qui sont alors phagocytés par les macrophages environnants.

Dans une moindre mesure, les macrophages M1 jouent un rôle dans l'immunité adaptative, les cytokines qui les activent (IFN γ) étant en partie produites par les lymphocytes Th1.

Régulation de la réponse acquise

L'absence d'effet secondaire de la réponse immunitaire adaptative pour les cellules de l'hôte est conditionnée par la capacité des cellules immunitaires à différencier les antigènes d'origine exogène des produits issus des cellules de l'hôte, on parle de reconnaissance du soi. Elle passe par une tolérance dite centrale qui consiste à sélectionner négativement des lymphocytes T dans le thymus lors de leur formation : les lymphocytes qui réagissent trop fortement à des antigènes du soi sont éliminés. La tolérance périphérique quant à elle, repose sur l'anergie clonale qui résulte de l'absence d'activation des lymphocytes par manque de co-stimulation lors de la liaison avec un antigène présenté par une CPA.

Certains lymphocytes ont des propriétés régulatrices de la réponse immunitaire (lymphocytes Treg). En plus de libérer des cytokines anti-inflammatoires (IL10, TGF β), ils inhibent la prolifération des lymphocytes T auxiliaires. L'IL-10 inhibe la synthèse de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, ainsi que l'expression du CMH et des molécules de co-stimulation des CPA. Le TGF β régule la croissance, la différenciation et le fonctionnement de toutes les classes de lymphocytes, macrophages, et cellules dendritiques. Ils peuvent aussi induire l'apoptose des lymphocytes T cytotoxiques par la voie des perforines-granzymes.

Les anticorps jouent également un rôle essentiel dans la régulation de la réponse immunitaire acquise en exerçant un rétrocontrôle négatif sur leur propre synthèse.

Il existe en outre des récepteurs inhibiteurs dont le rôle est de limiter l'inflammation et de la stopper à terme. Les lymphocytes B et T en possèdent, limitant ainsi leur prolifération respective.

2.3. Cas de *Staphylococcus aureus* : immunogénicité et facteurs de virulence

Staphylococcus aureus est un coque Gram + qui s'organise en grappe et se caractérise par la coloration dorée de ses colonies lorsqu'il est cultivé sur gélose (Lowy 1998). Il possède un métabolisme aérobie facultatif et peut fermenter le glucose. Il a aussi la capacité de synthétiser des catalases mais n'est pas producteur d'oxydases.

2.3.1. Structure

L'organisation structurelle de *S. aureus* est typique de celle des bactéries Gram positives (**Figure 7**).

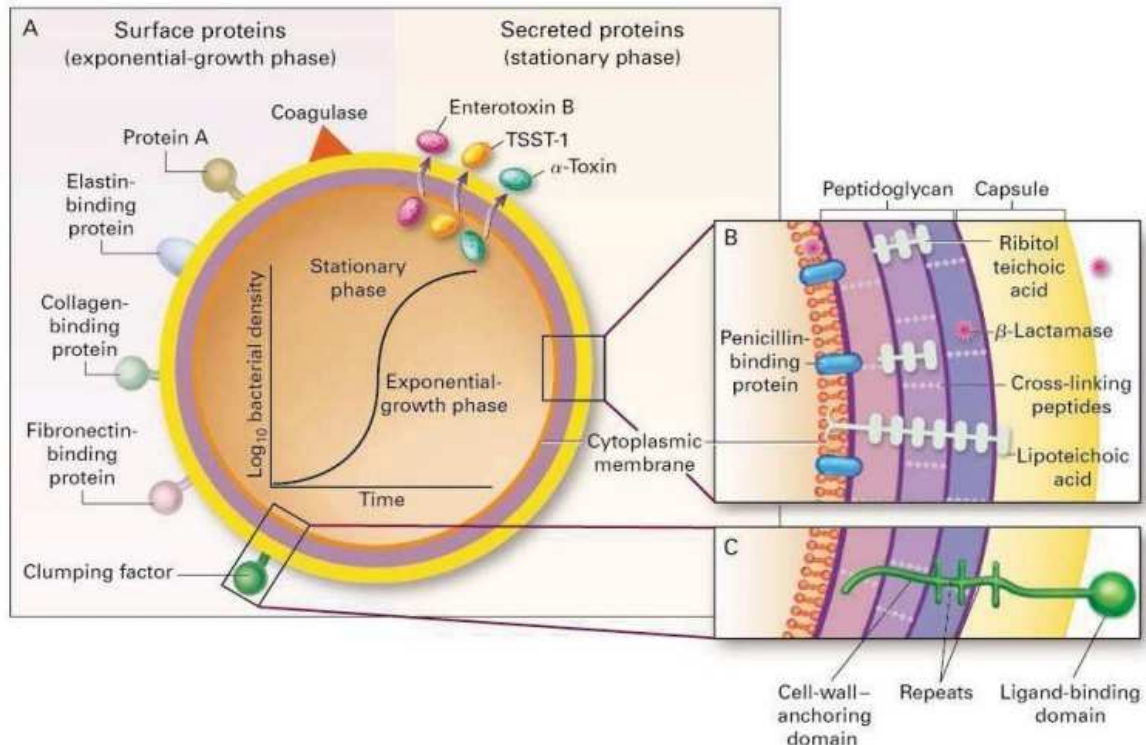


Figure 7: Organisation structurelle de la bactérie *Staphylococcus aureus* (Lowy 1998)

A : protéines exprimées en surface et protéines sécrétées en fonction de la phase de croissance, B : organisation de la paroi bactérienne et de la capsule, C : détail de l'organisation du « clumping factor », similaire à celle de la majorité des protéines de surfaces.

Sa paroi est un exosquelette rigide entourant la membrane cytoplasmique et elle est composée de protéoglycanes et d'acides téichoïques. D'un point de vue immunitaire, les protéoglycanes agissent comme des toxines et entraînent l'activation des macrophages, du complément et l'agrégation plaquettaire. Les acides téichoïques sont des PAMPs qui déclenchent la réponse immunitaire lorsqu'ils sont reconnus par les PRR de l'hôte. La plupart des staphylocoques ont une capsule de nature polysaccharidique. Chez certaines souches, elle est associée à la production de biofilms, qui sont un facteur de résistance important de la bactérie. Le génome de la bactérie est constitué d'un chromosome bactérien d'environ 2800 paires de bases, associé à divers éléments extra-chromosomiques (plasmide), généralement porteurs des facteurs de virulence.

2.3.2. Facteurs de virulence

Les **protéines de surface** ont une structure semblable : elles sont constituées d'un domaine intra-cytoplasmique, d'un domaine hydrophobe enchâssé dans la membrane cellulaire, d'une zone d'ancrage dans la paroi bactérienne et d'un domaine extra-pariétal, pouvant jouer le rôle d'adhésine et favoriser l'internalisation de la bactérie dans les cellules de l'hôte.

D'autres, comme la protéine A, sont capables de fixer la partie invariable des anticorps, empêchant ainsi la phagocytose. Enfin les MSCRAMM (Microbial-Surface Components Reconizing Adhesive Matrix Molécules), forment un complexe protéique qui jouerait un rôle majeur dans la capacité des staphylocoques à envahir les tissus de l'hôte.

Les staphylocoques produisent aussi un grand nombre de protéines sécrétées. Leurs actions sont variées.

- Les **cytotoxines**, comme l' α -toxine, provoquent la formation de pores dans la membrane cellulaire associées à d'autres modifications pro-inflammatoires dans la cellule de l'hôte. Les dommages cellulaires engendrés participent à l'apparition du syndrome septique.
- Les **toxines pyrogéniques** sont des superantigènes capables de se lier aux protéines du CMH II, induisant la prolifération des cellules T et la production de cytokines. Les toxines pyrogéniques les plus connues sont les entérotoxines, responsables d'intoxication alimentaire en cas d'ingestion, et la toxine du syndrome du choc toxique 1 (TSST-1), présente dans 20 % des souches de *S. aureus*, et structurellement très proche des entérotoxines.
- Les **enzymes** sont responsables de la destruction des tissus et facilitent la dissémination des bactéries. On peut par exemple citer la β -lactamase, enzyme membranaire responsable de l'inactivation de certains antibiotiques de la famille des β -lactamines, et la coagulase qui active la prothrombine et induit la conversion du fibrinogène en fibrine.

3. Problématique des mammites et ses solutions, à l'échelle de l'élevage et de la filière

3.1. Facteurs de risque des mammites

3.1.1. Facteurs individuels

Ces facteurs sont liés aux caractéristiques individuelles de la brebis, mais peuvent avoir un impact sur l'ensemble du troupeau. Tout d'abord, certaines lignées particulièrement sensibles aux mammites ont été identifiées. Il a été montré que les lignées haute productrices avaient tendance à être plus sensibles aux mammites (Francis Barillet et al. 2001; Gonzalo et al. 2005). Le support génétique d'une partie de la sensibilité aux mammites a été mis en évidence par plusieurs études (Barillet et al. 2001; Rupp et al. 2014; Banos et al. 2017).

Les caractéristiques morphologiques de la mamelle ont des conséquences sur l'incidence des mammites, notamment les mammites subcliniques. Un plancher de la mamelle trop bas est associé à des problèmes d'hygiène et à une moins bonne extraction du lait lors de la traite ; des trayons avec un site implantation ou une orientation anormales peuvent interférer avec la traite en empêchant la bonne tenue des manchons trayeurs et de la griffe (Rovai et al. 2004). Tout cela peut être la cause d'une sous-traite et favorise la rétention de lait dans la mamelle. Là aussi, des facteurs génétiques sont impliqués et certaines analyses ont montré qu'une sélection pour un meilleur rendement laitier serait associée à une dégradation de la morphologie mammaire (Caja, Such, et Rovai 2004).

Enfin, certaines co-infections favorisent les IIM. Les thélites (inflammations des trayons) dues à une papillomatose, à de l'ecthyma contagieux ou encore à des staphylocoques cutanés constituent d'une part une source prédominante de germes (de Staphylocoques principalement), et d'autre part une cause de douleur lors de la traite, ce qui favorise la sous- traite (Bergonier et al. 1997; Bergonier et Berthelot 2003).

3.1.2. Facteurs liés à la traite

La traite constitue un moment où le risque d'apparition des mammites est grand. La traite manuelle, au moins autant que la traite mécanique est un facteur de risque d'apparition des mammites subcliniques (Bergonier et Berthelot 2003; Gonzalo et al. 2005). Un défaut d'hygiène de la machine à traire (anomalies lors du nettoyage, utilisation d'eau contaminée, etc.) favorise la contamination des mamelles. L'absence d'antisepsie des trayons après la traite est également associée à une incidence de mammite augmentée (Bergonier et al. 1997; Bergonier et Berthelot 2003).

Des anomalies dans les réglages de la machine à traire (niveau de vide, décrochage automatique, pulsation, etc.) sont responsables du phénomène d'impact : toute fluctuation du vide provoquée par une entrée d'air au niveau d'un manchon trayeur entraîne la propulsion de lait dans l'hémi-mamelle controlatérale, favorisant ainsi la contamination bactérienne. Le renouvellement insuffisant des manchons trayeurs, le décrochage manuel sans coupure préalable du vide favorisent aussi ces entrées d'air et entraînent le phénomène d'impact.

Enfin, plusieurs facteurs liés à la traite favorisent la sous-traite et la rétention de lait, facilitant la multiplication bactérienne dans la citerne. Elles sont provoquées par de mauvais réglages du temps de traite (trop court), du niveau de vide ou de la pulsation qui peuvent engendrer des thélites traumatiques, et rendre la traite douloureuse (Bergonier et al. 1997; Bergonier et Berthelot 2003; Contreras et al. 2007).

3.1.3. Facteurs de conduite d'élevage

Certaines pratiques d'élevage favorisent l'apparition des mammites. L'utilisation d'antibiotiques au tarissement tend à améliorer considérablement la santé mammaire lors de la lactation suivante (Gonzalo et al. 2004). Néanmoins, l'application intra-mammaire d'antibiotiques dans de mauvaises conditions d'hygiène peut être source de contamination de la mamelle et de mammites au début de la période sèche ou de la lactation (Paape et al. 2001; Gonzalo et al. 2005; Contreras et al. 2007).

Pour les mammites subcliniques et cliniques avec des signes légers, la persistance de l'infection dépend beaucoup de la capacité de détection et de l'intervention de l'éleveur (Bergonier et al. 1997).

L'allaitement des agneaux est une période à risque car ils sont responsables de la transmission de germes, soit d'une brebis à l'autre (*Staphylococcus spp.* notamment) (Bergonier et Berthelot 2003), soit comme source principale d'autres agents pathogènes comme *Mannheimia haemolytica* (Fragkou et al. 2011). Ce phénomène est d'autant plus marqué que les brebis atteintes de mammites produisent moins de lait, ce qui pousse leurs agneaux à téter d'autres brebis.

L'environnement peut jouer un rôle dans l'apparition des mammites due à certains agents qui sont présents sur la litière (Entérobactéries, *P. aeruginosa*, *A. fumigatus*). Une densité animale trop élevée est associée à l'augmentation de l'incidence des mammites (Menzies et Ramanon 2001). L'utilisation de matières premières contaminées (fourrages, eau, etc.) est aussi vectrice de germes responsables d'infection intra-mammaire (Bergonier et al. 1997; Bergonier et Berthelot 2003),

Enfin, certaines carences alimentaires ont montré l'importance de certains oligo-éléments et vitamines dans la sensibilité aux mammites, notamment l'insuffisance d'apports en vitamine A et β -carotène, ou encore en vitamine E et sélénium (Bergonier et Berthelot 2003).

3.2. Prise en charge et prévention

La prise en charge des mammites a pour but principal de limiter la prévalence des mammites subcliniques afin de maintenir une qualité du lait satisfaisante. Les facteurs de risque décrits précédemment sont autant de leviers d'action sur lesquels agir. Le traitement des mammites cliniques est un enjeu plus ou moins secondaire à l'échelle d'un élevage, et a pour but principal la guérison clinique et le bien être de l'animal.

3.2.1. *Éléments liés à la conduite d'élevage*

À l'échelle du troupeau, la gestion des mammites s'effectue principalement par la **réforme** des brebis atteintes. Les principaux critères de décision sont la présence de séquelles sur la mamelle (induration diffuse, abcès, atrophie, etc) ou des anomalies de morphologie (mauvaise orientation des trayons, pis pendulaire) rendant la traite difficile. Pour les cas cliniques, les brebis doivent être écartées du lot de production, jusqu'à leur sortie afin de limiter les risques de contamination. Les mammites récidivantes sont aussi un motif de réforme (Bergonier et Berthelot 2003). Les réformes pour cause de mammite subclinique pourront être décidées après analyses des CCS, avec l'adaptation possible des seuils en fonction de la prévalence estimée dans le troupeau et des objectifs de l'éleveur (Berthelot et al. 2006).

Une bonne gestion de la pression infectieuse dans l'environnement passe par la maîtrise de l'**ambiance du bâtiment**. Un paillage suffisant et régulier, la maîtrise de la densité animale dans les parcs (notamment lors de la période d'agnelage), et la ventilation sont autant de facteurs qui influencent directement l'humidité globale à l'intérieur du logement et la pression d'infection.

Les apports **en oligoéléments et vitamines** (notamment en vitamine E et sélénium) durant la période sèche ne semble pas avoir d'effet sur l'apparition des mammites cliniques ou sur la prévalence globale des infections intra-mammaires, mais elle réduit significativement les CCS lors de la lactation suivante (Menzies et Ramanoon 2001).

3.2.2. *Facteurs liés à la traite*

L'**entretien de la machine à traire** est essentiel pour le contrôle des mammites à l'échelle du troupeau car elle est potentiellement source de contamination, de dissémination voire d'aggravation des mammites. De façon générale, l'hygiène des installations doit être assurée. Le nettoyage de la machine à traire deux fois par jour en alternant détergent acide et solution basique est conseillé pour éviter la multiplication bactérienne dans le lactoduc. Un contrôle des installations et des réglages (niveau de vide, pulsation, temps de traite) par un technicien spécialisé est recommandé annuellement. Par ailleurs, le remplacement régulier des manchons trayeurs permet de limiter les lésions mécaniques des trayons et le phénomène d'impact (tous les ans pour les manchons en caoutchouc et tous les 2 ans pour les manchons en silicone) (Bergonier et Berthelot 2003; Contreras et al. 2007).

L'**antiseptie des trayons en fin de traite** permet de traiter d'éventuelles lésions des trayons (Bergonier et Berthelot 2003) et permet de réduire significativement les nouvelles infections (Paape et al. 2001; Contreras et al. 2007). Il s'agit d'une mesure lourde à mettre en place en raison des effectifs d'animaux, mais elle peut être intéressante dans les troupeaux à forte prévalence lors de la période à risque, même de façon limitée dans le temps. Le produit peut être appliqué par trempage ou par pulvérisation, plus adaptée pour les petits ruminants à cause de la petite taille des trayons. Néanmoins, l'efficacité des produits utilisés est variable (Klinglmair, Winter, et Baumgartner 2005), et l'apparition de résistance des Staphylocoques à certains agents désinfectants a été décrite (Bjorland et al. 2005). Le contrôle de l'efficacité de la désinfection post-traite est donc recommandé.

D'autres pratiques de traite sont susceptibles d'améliorer la situation du troupeau vis à vis des mammites, notamment la présence d'un **ordre de traite** (primipares saine puis multipares saines puis brebis avec mammite) mais sont rarement adoptées en pratique à cause de leur difficulté de réalisation.

3.2.3. Utilisation de produits vétérinaires

Des essais **vaccinaux contre les IIM** ont été mis en œuvre. Les vaccins contre les mammites à *S. aureus* ont une efficacité variable vis à vis des mammites cliniques ; ils sont relativement peu efficace vis à vis des mammites subcliniques (Amorena, Baselga, et Albizu 1994; Tollersrud et al. 2002; Bergonier et al. 2003; Contreras et al. 2007). En France, un vaccin inactivé à *S. aureus* à destination des petits ruminants est commercialisé (« Résumé des Caractéristiques du Produit : VIMCO EMULSION INJECTABLE POUR BREBIS ET CHEVRES » 2019). La souche de *S. aureus* (SP140 CP8) a été choisie pour son isolement fréquent de mammites des petits ruminants. Productrice de biofilm, son immunogénicité est meilleure que les souches qui ne le sont pas (Gogoi-Tiwari et al. 2015). Toutefois, son efficacité reste limitée (réduction de l'incidence des mammites subcliniques, possible réduction des signes cliniques). La nécessité de renouveler les injections avant chaque lactation pose aussi la question de la pertinence de sa mise en œuvre dans les exploitations. À ce jour, les vaccins ne sont donc pas un outil fiable pour le contrôle des mammites dans les élevages (Bergonier et al. 2003). Leur utilisation pourra être envisagée après mise en place d'un programme de prévention, en cas de forte prévalence au sein du troupeau. En revanche, la vaccination contre l'ecthyma contagieux, facteur favorisant l'apparition des mammites, peut entrer dans une démarche de contrôle des mammites.

L'**antibiothérapie en lactation** est globalement peu utilisée pour le traitement des mammites cliniques, excepté lors de mammites modérées à sévères, dans le but de sauver

l'animal et de le réformer à court ou à moyen termes. L'administration se fait généralement par voie parentérale, avec des bêta-lactamines ou des macrolides selon les agents pathogènes visés (Bergonier et al. 2003). La voie intra-mammaire n'est pas fréquemment utilisée pour des raisons économiques et pratiques. Par ailleurs, aucune spécialité antibiotique intra-mammaire n'a d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en France pour le traitement des mammites ovines en lactation.

L'**antibiothérapie au tarissement** peut aider à une maîtrise des mammites à l'échelle du troupeau. L'efficacité de l'utilisation des antibiotiques au tarissement a été démontrée : elle permet de réduire l'incidence des IIM et limiterait les nouvelles infections, bien que les résultats varient en fonction des études (Paape et al. 2001; Gonzalo et al. 2004; Bergonier et al. 2003). En cas d'administration intra-mammaire, la glande mammaire doit être préalablement vidée, le trayon désinfecté avec une lingette imprégnée de solution hydroalcoolique afin de limiter le risque de contamination au moment de l'injection. La canule doit être introduite partiellement afin d'éviter le traumatisme du trayon dont le diamètre est étroit (Bergonier et al. 2003). En France, une seule spécialité intra-mammaire à base de céfazoline (céphalosporine de 1ère génération), a une AMM pour le traitement de la brebis laitière au tarissement, dans le cadre du traitement des mammites subcliniques dues à des Staphylocoques coagulase-négatifs.

3.3. Sélection génétique des ovins laitiers

En plus des mesures pratiques à l'échelle de l'élevage, des mesures collectives à l'échelle nationale ou du bassin de production participent à la prévention des mammites.

3.3.1. Organisation de la sélection des races ovines laitières françaises

La sélection des animaux d'élevage a été pratiquée de tous temps par les éleveurs en favorisant la reproduction des individus les plus adaptés aux besoins de leur exploitation, en se basant sur des observations extérieures et subjectives. A partir des années 1950, l'identification systématique des animaux, l'apparition de l'insémination artificielle (IA) et du contrôle des performances ont permis une sélection plus rationnelle (INRA et IDELE 2011). En France, l'amélioration génétique des brebis laitières dans les trois bassins d'élevage traditionnels est fondée sur la sélection des races locales dans leur terroir respectif. Cinq races de brebis laitières sont représentées sur le territoire, et correspondent chacune à un bassin de production. La race Lacaune est élevée dans le bassin de Roquefort, les ROLP (Races Ovines Laitières de Pyrénées), composées des races Manech à tête rousse, Manech à tête noire,

Basco-béarnaise, dans les Pyrénées Atlantiques, et la race Corse sur l'île du même nom. Dans les races ovines laitières, la sélection génétique se fait en race pure. Pour chaque race, il existe des organismes de sélection dont le rôle est de coordonner la sélection de la race. Les programmes de sélection sont gérés par les entreprises de sélection. Pour la race Lacaune lait par exemple, l'organisme de sélection est l'UPRA Lacaune (gère les races Lacaune lait et Lacaune viande), et les entreprises de sélection sont la Confédération de Roquefort et la coopérative Ovi-test.

L'élevage des races ovines laitières repose sur un système pyramidal (**Figure 8**). Dans les élevages sélectionneurs, l'IA est plus ou moins utilisée (de 35 % pour la race Corse, jusqu'à 85 % pour la race Lacaune en 2018) afin de raisonner les accouplements et ainsi produire des animaux à haute valeur génétique, issus du croisement des meilleures brebis (mères à béliers) avec les meilleurs béliers de la race (pères à béliers ou béliers Elite) (France Génétique Elevage 2010; Thomas, Astruc, et Bourrigan 2018).

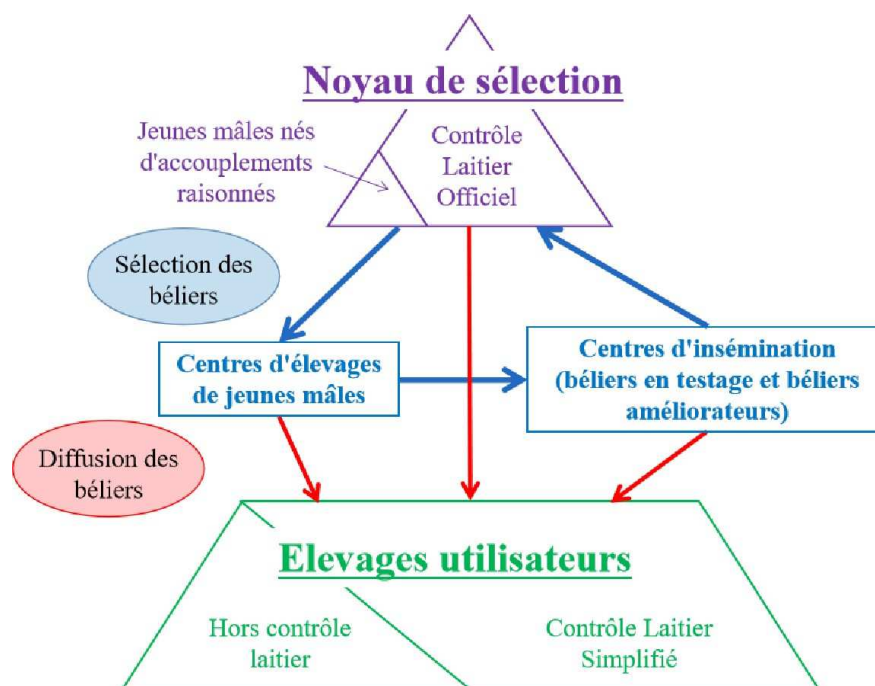


Figure 8: Organisation pyramidale de la population des races ovines laitières françaises (France Génétique Elevage 2010; Barillet et al. 2016)

Pour les races laitières, l'enjeu de la sélection est porté sur la production laitière, exprimée par les femelles. Par conséquent, le testage sur descendance des mâles issus des accouplements des mères à béliers et pères à béliers (ou béliers Élités) constitue l'étape essentielle du schéma de sélection classique. Certains de ces jeunes mâles sont retenus pour entrer en centre d'élevage à un mois d'âge, où ils sont élevés jusqu'à 8-15 mois selon la race.

Une première sélection y est opérée selon différents critères (standard de race, conformation, fonction sexuelle). Les béliers sélectionnés entrent alors en centre d'IA et sont mis en testage sur descendance dans le noyau de sélection. Une centaine de doses de semence par bélier sont utilisées dans 7 à 8 élevages sélectionneurs afin d'obtenir une quarantaine de filles en lactation. A l'âge de 2 ans et demi, selon les résultats du testage, les béliers les plus performants sont conservés comme béliers améliorateurs. Les meilleurs d'entre eux seront les nouveaux pères à béliers utilisés dans les élevages sélectionneurs. Les béliers sélectionnés dans les centres d'IA, les centres d'élevage ou présents dans le noyau de sélection sont alors diffusés dans les élevages utilisateurs et servent à enrichir génétiquement la population globale de la race (France Génétique Elevage 2010; Barillet et al. 2016). On parle de taux de diffusion pour quantifier l'utilisation des béliers issus du noyau de sélection (IA ou MN – Monte Naturelle) par les éleveurs utilisateurs. Plus le taux de diffusion est proche de 100 %, plus rapidement les élevages utilisateurs profiteront du progrès génétique créé par la sélection (Barillet et al. 2016).

Pour les élevages sélectionneurs, le contrôle des performances se fait obligatoirement par le CLO (Contrôle Laitier Officiel). C'est pourquoi ce dernier doit fournir des résultats dont la précision est compatible avec une valorisation en termes d'évaluation génétique : les données ainsi récoltées participent à l'évaluation génétique des individus et à l'indexation des béliers. Les élevages utilisateurs du progrès génétique peuvent quand à eux adhérer au CLS (Contrôle Laitier Simplifié) qui consiste en un contrôle des performances allégé. Il aide à la sélection génétique intra-troupeau et sert d'appui technique pour les éleveurs, notamment en terme de gestion des mammites.

Dans chaque race, environ un quart de la population de la race constitue le noyau de sélection. Le reste de la population est constituée d'élevages utilisateurs du progrès génétique. Selon les races, les effectifs sont très variables (**Tableau 2**).

Tableau 2: Importance des schémas de sélection des races ovines laitières françaises en 2014 (Source : Idele et CNBL 2015) (Astruc et al. 2016)

Race	Taille de population ♀	Taille du noyau de sélection ♀ (%)	Nombre de béliers mis en testage par an	Nombre de béliers présents en centre d'IA ♂
Lacaune	890 000	172 462 (19)	440 ♂	1400 ♂
Manech Tête Rousse	274 000	80 260 (29)	150 ♂	600 ♂
Manech Tête Noire	80 000	12 438 (16)	30 ♂	175 ♂
Basco-béarnaise	80 000	24 386 (32)	50 ♂	200 ♂
Corse	83 000	15 944 (19)	30 ♂	150 ♂

3.3.2. *Évaluation des performances et sélection classique*

Les béliers en testage sont évalués en fonction de leurs performances propres (paramètres de reproduction, génotype PrP déterminant la résistance à la tremblante) (Astruc et Buisson 2018) et de celles de leurs filles nées dans le noyau de sélection. La finalité du testage des béliers est l'indexation, qui consiste à allouer à chaque individu une valeur ISOL (Index de Synthèse Ovin Lait) qui traduit son potentiel génétique en tenant compte d'une combinaison de plusieurs caractères d'intérêt. Les caractères inclus dans l'ISOL varient selon la race (**Tableau 3**). Le CLO ayant cours dans les élevages sélectionneurs permet de récolter des résultats de performances de la descendance des béliers en testage et de calculer leur valeur ISOL (Barillet et al. 2016).

Tableau 3: Caractères génétiques sélectionnés et progrès génétique annuel par race en 2014 (Source : Idele et CNBL 2015) (Barillet et al. 2016)

* Lait : volume de lait produit ; TB : taux butyreux, TP : taux protéique ; CCS : comptage de cellules somatiques, mamelle : morphologie mammaire. ISOL: Index de Synthèse Ovin Lait

Race	Caractères* dans l'ISOL	Progrès génétique estimé
Lacaune	Lait, TB, TP, CCS, mamelle	0,23 σ_g
Manech Tête Rousse	Lait, TB, TP	0,17 σ_g
Manech Tête Noire	Lait, TB, TP	0,11 σ_g
Basco-béarnaise	Lait, TB, TP	0,16 σ_g
Corse	Lait	0,10 σ_g

Le CLO des brebis laitières est allégé par rapport à celui pratiqué dans les élevages bovins, essentiellement pour des raisons de faisabilité et de coût (Barillet et al. 2016). L'évaluation de la quantité de lait produite est obligatoire et effectuée systématiquement tous les mois pour toutes les brebis des élevages sélectionneurs, mais les caractères de qualité du lait sont en revanche recherchés de façon facultative. L'ICAR (International Committee for Animal Recording) promeut l'utilisation du Contrôle Laitier Qualitatif Ponctuel (CLQP), qui consiste à doser les taux protéiques (TP) et butyreux (TB), et les CCS sur 2 à 3 prélèvements dans les 4 premiers mois de la lactation des brebis primipares pour les ROLP ou sur les primipares et les brebis en deuxième lactation en race Lacaune. Les résultats ainsi obtenus sont utilisables pour la sélection car leur représentativité est suffisante (extrapolation possible sur les lactations suivantes), et le nombre de prélèvements assure une bonne estimation de l'héritabilité (qui traduit la capacité à être transmis à la descendance), compatible avec les objectifs de sélection. Ces données sont également complétées par des relevés (notamment TB et TP) effectués sur le lait de tank de tous les élevages.

La principale contrainte du testage sur descendance est la durée nécessaire à l'obtention de l'information génétique et le choix des géniteurs : l'intervalle de génération, qui correspond à l'âge des béliers en fin de testage, varie de 3,7 à 5,3 ans selon la race (Astruc et al. 2016). Son efficacité est néanmoins bien démontrée avec un progrès génétique global compris entre 0,10 à 0,23 σ_g par an selon la race (σ_g : écart type génétique), c'est à dire une évolution de 1 à 2,3 % de la moyenne du noyau de sélection (**Tableau 3**). Avec un taux de diffusion de 100 %, le progrès génétique des élevages en CLO et CLS est identique, mais avec 5 à 6 ans d'écart en faveur des élevages en CLO.

La santé mammaire a été incluse dans les objectifs de sélection de la race Lacaune en 2005, en intégrant le facteur CCS et la morphologie de la mamelle dans la détermination des valeurs ISOL (**Tableau 3**). Pour cette race, les CCS ont été évaluées en CLO à partir de 1999 et la morphologie mammaire dès 2000. Pour les ROPL, les CCS sont évaluées dans le cadre du CLO depuis 2002, et sont intégrés à l'ISOL depuis 2016 (Barillet et al. 2016; Astruc et Buisson 2018; Astruc 2017). Le poids accordé à ces caractères varient selon la race : pour la race Lacaune, 50 % de l'effort de sélection est porté sur les caractères fonctionnels (CCS et morphologie de la mamelle), tandis qu'en ROLP, il s'élève à environ 8 % (Astruc et Buisson 2018; Astruc 2017).

3.3.3. *Evolution vers la sélection génomique*

Principe de la sélection génomique

La génomique repose sur l'identification de QTL (Quantitative Trait Loci), qui sont des régions chromosomiques ayant un effet quantitatif significatif sur un caractère d'intérêt pour l'élevage. Chaque QTL est détecté grâce à des marqueurs génétiques appelés SNP (Single Nucleotide Polymorphism) qui sont des mutations ponctuelles de la séquence d'ADN.

La sélection génomique est utilisée depuis les années 1990-2000 sous forme de **sélection assistée par gène** (SAG) (INRA et IDELE 2011). Elle repose sur l'identification de certaines mutations responsables des QTL. Pour les ovins laitiers, l'exemple le plus marquant est celui du gène *PrnP* associé à la variabilité de la sensibilité des animaux à la tremblante. Les animaux présentant le génotype « résistant » (allèles ARR/ARR) pour ce gène ont été sélectionnés et peu à peu les allèles associés à la réceptivité et à la sensibilité des animaux à la tremblante ont disparu de la population. La connaissance de la localisation exacte de la mutation d'intérêt permet de cibler précisément le séquençage et réduit ainsi considérablement les coûts de mise en œuvre des analyses génétiques et leurs difficultés d'interprétation.

Dans de nombreux cas, la mutation responsable du QTL n'a pas été identifiée, La **sélection assistée par marqueur** (SAM) est alors utilisée (INRAet IDELE 2011). Elle repose sur le postulat qu'un marqueur génétique (SNP) associé à un QTL n'est pas responsable du QTL mais, qu'en se situant très près de la mutation responsable, il y sera plus ou moins toujours associé (on parle de déséquilibre de liaison - DL). Ainsi, en génotypant le SNP, il est possible de connaître le génotype du gène responsable du QTL. Le marqueur SNP a un effet apparent lié à son association avec le gène. La SAM applique ce principe en sélectionnant les allèles marqueurs présentant un effet apparent favorable pour le caractère étudié.

L'efficacité de la SAM dépend de plusieurs facteurs :

- Cette sélection est d'autant plus efficace que le nombre de gènes expliquant la variabilité génétique est réduit. Quand un caractère est défini par un seul gène, la sélection d'un seul allèle suffit. Quand il existe plusieurs gènes sous-jacents, il est nécessaire de doubler l'effort de sélection pour sélectionner tous les allèles favorables pour le caractère ciblé.
- Le progrès génétique que l'on peut attendre de la sélection d'un marqueur dépend de la part de la variabilité génétique du caractère expliquée par le QTL : si une grande partie de cette variabilité est expliquée par le QTL, la sélection des allèles favorable aura un effet considérable sur le phénotype. *A contrario*, la sélection n'aura que très peu d'effet si le QTL n'explique qu'une part minime de la variabilité du caractère d'intérêt.
- La SAM dépend aussi très fortement du degré de déséquilibre de liaison (DL) entre le gène responsable du QTL et le marqueur SNP. Si le DL existe et est complet, la sélection de l'allèle du SNP apparemment favorable sera toujours associée à la sélection concomitante de l'allèle favorable du gène responsable du QTL. Si le DL est partiel, la sélection d'un allèle pour le SNP n'assure pas la sélection concomitante du gène d'intérêt. C'est pourquoi raisonner en considérant non plus les allèles individuellement mais les haplotypes (i.e. le groupe d'allèles de différents loci situés sur un même chromosome et habituellement transmis ensemble) permet de mettre en évidence des DL plus forts que les SNP seuls.
- La SAM est d'autant plus efficace que l'effet des marqueurs est estimé de façon précise. Cela dépend essentiellement de la taille de la population de référence utilisée pour le mettre en évidence. Si les performances mesurées sont nombreuses, l'effet du marqueur sera précisément estimé.

La **sélection génomique** (SG) est une variante de la SAM qui ne considère pas que les QTL confirmés et cartographiés, mais tous les QTL présents sur le génome à l'aide de modélisations statistiques. Divers modèles peuvent être utilisés, plus ou moins efficaces. Ils diffèrent par leur précision, le nombre de résultats nécessaire à leur utilisation et le coût de leur mise en œuvre (INRA et IDELE 2011; Robert-Granié, Legarra, et Ducrocq 2011).

La sélection génomique des ovins laitiers en France.

Les bases de la sélection génomique ovine ont été posées entre 2009 et 2011 par le projet SheepSNPQTL, qui a utilisé une puce de génotypage pangénomique 54K SNP. Ce projet a permis le génotypage de près de 4000 ovins, toutes races confondues (laitières, allaitantes, laineuses). Les objectifs de ce projet étaient l'identification de régions QTL précises associées à des caractères d'intérêt (résistance aux mammites, aux parasites, production laitière ou bouchère, etc.), la volonté de préciser la carte des 54 000 SNP génotypés et la collecte de données dans les races laitières pour constituer les premières populations de référence, bases de la SG. Ce projet a permis le lancement en 2010 du projet européen 3SR (Sustainable Solution for Small Ruminants) dont le but est l'identification des mutations causales d'une partie des QTL sur plusieurs caractères d'intérêt dont la résistance aux mammites (INRA et IDELE 2011).

La SG chez les bovins laitiers a de nombreux avantages quand on la compare à la sélection sur descendance : moins coûteuse, elle autorise le testage d'un plus grand nombre de taureaux, aidant à la gestion de la variabilité génétique. L'intervalle de génération, d'environ 8 ans en sélection classique, est considérablement réduit. Pour les ovins laitiers, ces avantages sont moins nets. L'intervalle de génération en sélection classique est moindre (autour de 4 ans), le gain de temps lors du passage à la SG est donc moins important. De plus, le rapport coût du génotypage sur valeur économique du bélier est moins attractif. Par ailleurs, l'organisation des schémas de sélection en ovin lait est contrainte par l'utilisation de semence fraîche faiblement diluée et par la forte saisonnalité de la période de reproduction, ce qui implique nécessairement un haras de béliers de grande taille, qui de fait assure une variabilité génétique satisfaisante. Enfin, pour que la SG soit assez efficace, il est nécessaire d'avoir une population de référence assez grande. C'est le cas pour les races Lacaune et Manech à tête rousse, mais elle serait insuffisante pour les autres races laitières françaises.

Néanmoins, une expérimentation menée en race Lacaune en 2011 et 2012 pour valider les prédictions génomiques, et confirmer l'efficacité de la SG, a démontré la supériorité des index ISOL des béliers sélectionnés par sélection génomique par rapport à ceux sélectionnés par la sélection classique (Astruc et al. 2016).

La SG est utilisée en race Lacaune depuis 2015 et depuis 2017 pour les ROLP (Astruc et Buisson 2019). Elle est couplée à la sélection classique, et permet de diviser la pression de sélection en 2 phases (**Figure 9**) : la première sélection des béliers se fait à 3 mois d'âge après génotypage et attribution d'un ISOLg (ISOL génomique), et la seconde vers 2,5 ans d'âge, quand les premiers résultats de testage sur descendance sont disponibles (Astruc et al. 2016). Pour la race Corse, les béliers sont génotypés, mais à cause de la faible précision des index génomiques (petite population), les béliers ne sont considérés améliorateurs qu'après la phase de testage sur descendance (Astruc et Buisson 2019).

Des études ont recherché des QTL associés aux CCS chez les ovins et les caprins (Barillet et al. 2003; Rupp et al. 2014). Elles ont établi le caractère polygénique de la résistance aux mammites, même si certains QTL ont pu être identifiés avec un intervalle de confiance étroit et une significativité haute. Un des enjeux actuels est de cartographier précisément ces QTL pour identifier les mutations jouant un rôle dans la résistance aux mammites (Oget et al. 2018).

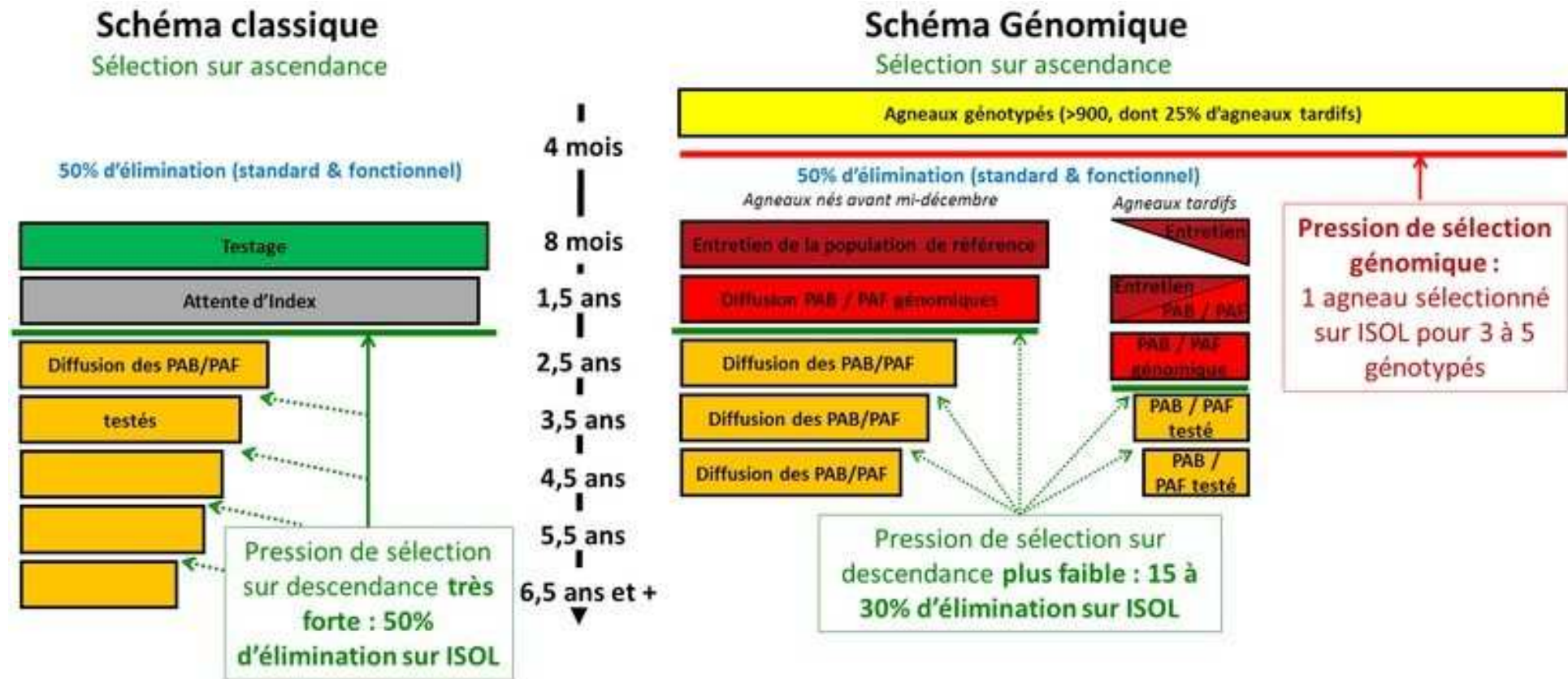


Figure 9: Comparaison des schémas de sélection classique et génomique dans la race Lacaune (Astruc et Buisson 2019)

PAB : pères à béliers ; PAF : pères à brebis ; ISOL : Index de Synthèse Ovin Lait

Chapitre 2 : Étude expérimentale

Comme nous l'avons vu précédemment, les mammites sont une dominante médicale dans les élevages de brebis laitières, à cause de la dégradation de la santé du troupeau qu'elles provoquent (Giadinis et al. 2012; Astruc 2017), mais aussi à cause des conséquences sur la transformation et l'économie de la filière laitière (Delacroix-Buchet, Barillet, et Lagriffoul 1994; Little et al. 2008; Rosengren et al. 2010). Pour un contrôle optimal, des mesures doivent être prises à l'échelle de l'élevage en termes d'évaluation du risque (CCS, bactériologie) et de prévention (amélioration de l'hygiène, réforme raisonnée, gestion du tarissement) (Bergonier et al. 2003; Bergonier et Berthelot 2003; Berthelot et al. 2006; Menzies et Ramanoon 2001). En parallèle, la sélection génétique de la plupart des races laitières françaises prend en compte des caractères fonctionnels de la mamelle dans les objectifs de sélection (Barillet et al. 2016; Astruc 2017; Astruc et Buisson 2018). La sélection génomique, récemment mise en place en complément de la sélection sur descendance, apporte l'espoir d'un progrès génétique à venir conséquent vis à vis de la résistance aux mammites (Astruc et al. 2016; Astruc et Buisson 2018).

Les défenses de la mamelle reposent sur la reconnaissance précoce des bactéries invasives ; c'est le rôle des cellules sentinelles du parenchyme et de l'organisme tout entier (Paape et al. 2007; Tizard 2009). Elles déclenchent l'émission de signaux cytokiniques et chimiotactiques qui attirent les leucocytes du sang vers le parenchyme mammaire et le lait. L'afflux de neutrophiles est essentiel pour l'élimination efficace des bactéries et se traduit par l'augmentation des CCS lors d'IIM (Paape et al. 2001). La réponse immunitaire est finement régulée afin de limiter les dommages concomitants sur les tissus, notamment par l'intermédiaire de protéines spécialisées, au sein desquelles les protéines SOCS, régulatrices de signaux de cytokines pro-inflammatoires (Kubo, Hanada, et Yoshimura 2003; Yoshimura et al. 2004; Yoshimura, Naka, et Kubo 2007).

De nombreuses études se sont intéressées au support génétique de la résistance aux mammites chez les ruminants laitiers (Heringstad, Klemetsdal, et Ruane 2000; Detilleux 2002; Rupp et Boichard 2003). En 2015, un QTL hautement significatif pour l'augmentation des CCS a été mis en évidence sur le chromosome OAR3 chez la brebis Lacaune (Rupp et al. 2015). Après séquençage de la région génomique correspondant à ce QTL, une mutation ponctuelle sur le gène *Socs2*, qui produit une mutation R96C de la séquence de la protéine du même nom, a été identifiée. L'analyse fonctionnelle de la protéine a montré une inactivation de cette dernière, empêchant sa liaison à ses ligands. Enfin, le génotypage de la population de référence a permis d'évaluer la fréquence de l'allèle muté à 21,7 % et une analyse phénotypique a montré l'augmentation significative de la production laitière et des CCS de la

descendance des béliers porteurs de cette mutation, surtout lors d'homozygotie. Elle serait donc délétère d'un point de vue de la santé de la mamelle (augmentation des CCS), mais amélioratrice pour le rendement laitier (meilleure production). Il apparaît alors important de s'intéresser en détail aux conséquences de cette mutation, tant positives que négatives, sur les caractères d'intérêt dans les races de brebis laitières.

Cette expérimentation fait partie du projet de recherche REIDSOCS (Robustness, Efficiency, Inflammation and Diseases under the control of SOCS-2), conduit en collaboration entre l'ENVT, l'INRA et l'Idel. Son but est de caractériser plus finement l'impact de la mutation R96C de la protéine SOCS-2 du point de vue phénotypique sur la réponse inflammatoire mammaire à la suite d'une infection, afin de pouvoir appréhender plus précisément son rôle et les conséquences favorables ou défavorables de sa présence.

Dans ce but, nous avons comparé la réponse inflammatoire de deux groupes de brebis, homozygotes pour l'allèle sauvage ou homozygotes pour l'allèle muté, à la suite d'une IIM expérimentale à *Staphylococcus aureus*. Différents paramètres d'intérêt ont été évalués : production, atteinte clinique systémique et mammaire, composition du lait, CCS, numération des sous-populations cellulaires du lait et du sang, concentrations de diverses cytokines dans le plasma et enfin un examen nécropsique comprenant diverses mesures. Dans cette thèse, nous décrivons et analysons les résultats en lien avec la **réponse immunitaire mammaire** vis à vis de l'IIM à *S. aureus*.

1. Matériel & Méthodes

1.1. Les brebis

L'expérimentation a été menée à l'ENVT en janvier et février 2018 sur seize brebis primipares nées et élevées au domaine expérimental INRA de Lafage dans l'Aveyron. Elles étaient issues de l'accouplement de brebis et béliers dont le génotype *Socs2* était connu. Certaines brebis avaient le même père (7 béliers pour 16 mères). Huit d'entre elles étaient homozygotes pour l'allèle sauvage (génotype C/C), les huit autres étaient homozygotes pour l'allèle muté (génotype T/T). Leur génotype a été vérifié *a posteriori* à l'aide de la technique KASPar précédemment décrite (Cuppen 2007; Rupp et al. 2015). Les brebis ont été transférées sur le site de l'expérimentation (ENVT) en décembre 2017 ; les mise-bas ont eu lieu entre le 28.12.2017 et le 05.01.2018. Les agneaux sont restés avec leurs mères pendant 1 à 2 semaines, puis ont été séparés et nourris avec le lait issu de la traite à l'aide d'une louve et de biberons. L'inoculation a eu lieu une semaine après la séparation et le début de la traite. Une brebis de chaque groupe a été écartée de l'étude pour cause de mammite clinique spontanée survenue avant l'inoculation. Au final, chacun des 2 groupes étudiés était constitué de sept brebis.

Tout au long de l'expérimentation, les deux groupes de brebis ont été conduits ensemble. Leur alimentation était constituée de foin distribué à volonté le matin, et d'aliments concentrés pour brebis laitières distribués au moment de la traite (250 g/brebis, 2x).

1.2. L'inoculation

Pour chaque brebis, l'hémi-mamelle à inoculer a été choisie en vérifiant l'absence de signes cliniques d'inflammation et d'infection de la mamelle, et en évaluant la CCS et la qualité bactériologique du lait dans les jours précédant l'inoculation (**Annexe 1**). L'hémi-mamelle avec la CCS la plus faible a été choisie pour l'infection expérimentale. Finalement, toutes les brebis ont été inoculées à droite, exceptée trois brebis qui ont été inoculées dans l'hémi-mamelle gauche. Ces dernières ont été marquées par un trait de couleur sur la toison dans le but d'éviter toute confusion lors des prélèvements et de la traite.

La souche de *Staphylococcus aureus* SA9A a été utilisée, sur la base de critères d'innocuité vis à vis de l'opérateur (sensibilité aux antibiotiques) et de la connaissance de la virulence lors d'IIM antérieures chez les brebis (expression clinique franche mais non létale).

De plus, il s'agit d'une souche représentative des souches ovines en terme de facteurs de virulence (Deverrière 2007). La souche SA9A a été mise en culture. Une étape préliminaire a permis de déterminer le délai nécessaire à la bactérie pour parvenir à la phase exponentielle de croissance et d'évaluer le titre bactérien ainsi obtenu. Les bactéries ont été collectées à ce stade de développement pour préparer l'inoculum. Des lavages successifs ont été réalisés et la concentration en bactéries a été régulièrement vérifiée par densité optique. Enfin, des dilutions ont été réalisées pour atteindre la concentration souhaitée pour l'inoculum, soit environ 10^3 ufc/mL.

Au moment de l'inoculation, un millilitre d'inoculum a été appliqué par voie intramammaire dans l'hémi-mamelle choisie, dans des conditions d'asepsie optimales. Le trayon était nettoyé et désinfecté à l'aide d'une lingette antiseptique ; un fin cathéter stérile était utilisé pour injecter l'inoculum dans la citerne du trayon (**Figure 10**).

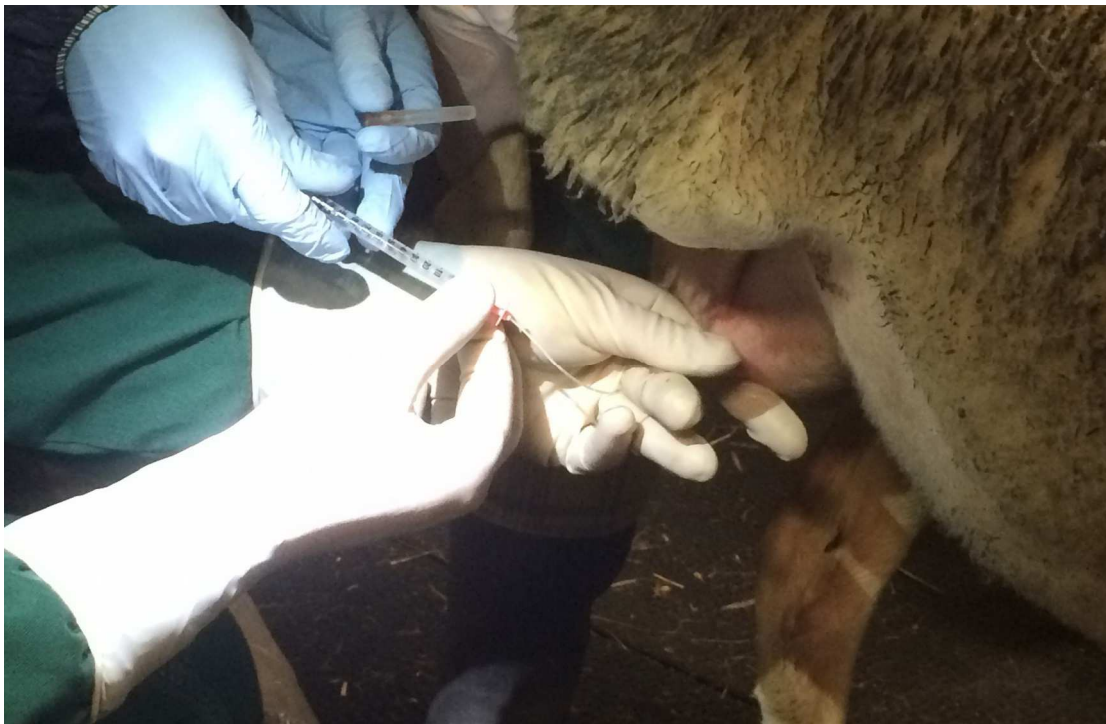


Figure 10: Inoculation d'une glande mammaire

L'inoculation marque le point de départ T0 de l'étude et sert de référence pour l'identification des autres points de contrôle.

1.3. La collecte des données phénotypiques en relation avec la santé de la mamelle

1.3.1. Mise en œuvre des examens cliniques et prélèvements

Durant l'expérimentation, à chaque point de contrôle, différentes étapes étaient réalisées successivement pour chaque brebis :

- l'élimination manuelle des premiers jets de lait,
- le prélèvement de lait pour analyse bactériologique,
- les prélèvements pour la mesure de la CCS, le typage des leucocytes du lait,
- les prélèvements pour le contrôle laitier au CIAL SO (Centre Interprofessionnel d'Analyses Laitières du Sud-Ouest),
- la traite (le cas échéant),
- l'examen clinique pour établir un score clinique mammaire.

Prélèvements de lait pour analyse sur site

À chaque date de prélèvement, les brebis étaient amenées sur le quai de traite. Une fois attachées au cornadis, les premiers jets étaient éliminés dans un bol trayeur à fond noir. Le prélèvement de lait pour analyse bactériologique était ensuite réalisé en respectant les conditions d'asepsie. Comme lors de l'inoculation, le trayon était désinfecté à l'aide d'une lingette antiseptique. Ensuite, 2mL de lait étaient collectés dans un tube stérile. L'opérateur portait systématiquement des gants, tout contact entre le tube et le trayon était évité. Les tubes étaient ensuite identifiés et placés au froid. Dans un second temps, les prélèvements pour les CCS et le typage des leucocytes du lait étaient effectués. Le lait était collecté par traite manuelle dans des pots de 25 mL pour comptage cellulaire ; ces tubes contenaient du bronopol (conservateur). Ils étaient ensuite identifiés avec le numéro d'identification de la brebis, le côté prélevé, et la date du prélèvement.

Traite, production laitière et prélèvements pour l'analyse au CIAL SO

La traite était effectuée biquotidiennement à heures fixes (8h00 et 16h00). Les manchons trayeurs n'étaient pas nettoyés entre chaque brebis mais ils étaient identifiés de telle sorte à réserver leur utilisation à l'hémi-mamelle saine ou à celle inoculée. À la fin de la traite, un produit de post-trempage était appliqué sur les trayons. À la fin de chaque traite, le circuit à lait de la machine à traire était lavé en alternance avec une solution acide et une solution basique, pour les deux traites journalières.

La production laitière par héli-mamelle était évaluée au moment de la traite à l'aide d'éprouvettes graduées reliées au circuit de traite. Tout volume prélevé pour analyse avant la traite était enregistré et ajouté à la production mesurée.

En outre, des prélèvements de lait ont été ponctuellement réalisés au cours de l'expérimentation pour des analyses complémentaires effectuées au CIAL SO (Centre Interprofessionnel d'Analyse Laitière du Sud-Ouest, Auch) et ont permis la mesure de la matière utile (Taux Butyreux - TB, Taux Protéique - TP), de l'urée ainsi que les CCS de chaque héli-mamelle avant et après inoculation. Ils étaient effectués au moment de la traite du soir puis à celle du lendemain matin en récoltant le lait une fois la traite terminée à partir des éprouvettes graduées, après homogénéisation par barbotage (création d'une entrée d'air). Le lait était prélevé dans les flacons prévus pour le comptage cellulaire, remplis au maximum. Après identification, les pots étaient groupés dans un panier de transport et conservés au froid avant d'être acheminés au CIAL SO. Pour certaines brebis, une agalactie résultant de l'infection est apparue après inoculation. Dans ce cas, les prélèvements effectués en priorité étaient ceux destinés à l'analyse bactériologique et ceux pour le comptage cellulaire sur site et typage leucocytaire, expliquant l'absence de données du contrôle laitier à certaines dates.

Examen clinique

L'examen clinique de chaque héli-mamelle par inspection, palpation et par examen macroscopique du lait a été réalisé par les deux mêmes opératrices tout au long de l'expérimentation (Charlotte Duhéron et moi-même). Les paramètres relevés étaient la couleur de l'héli-mamelle, la présence d'une réaction liée à la douleur lors de la palpation, la présence de chaleur, d'induration, de tuméfaction de la glande mammaire, la présence d'abcès et leur taille le cas échéant, le volume des nœuds lymphatiques mammaires et la modification de l'aspect du lait lors de l'élimination des premiers jets. Si la traite avait lieu lors du point de contrôle, l'examen de la mamelle était réalisé après la traite. Ces données ont ensuite été traduites en Score Clinique Mammaire ou SCM (voir paragraphes suivants).

Examen nécropsique

À la fin de l'essai, les brebis ont été euthanasiées et autopsiées. Un examen complet de la carcasse et des organes internes a été réalisé. La mamelle et les nœuds lymphatiques ont été pesés séparément en distinguant chaque côté et les lésions macroscopiques ont été enregistrées. Les lésions recherchées étaient les modifications d'aspect, de volume et de consistance de la mamelle, ainsi que la présence de fibrine et d'abcès.

Des échantillons du parenchyme mammaire lésé et des nœuds lymphatiques ont été prélevés sur chaque brebis et fixés dans du formol 10 %. Les prélèvements ont ensuite été recoupés et mis en cassettes, avant d'être inclus dans de la paraffine. Des coupes histologiques de 3 à 5 µm d'épaisseur ont été réalisées et colorées à l'hémalun-éosine en vue d'un examen par microscopie optique. Certaines hémimamelles n'ont pas été prélevées, en cas d'autolyse marquée des tissus et en cas d'absence de lésion macroscopique sur les hémimamelles non inoculées, pour des raisons de rentabilité (examen long et coûteux, intérêt réduit).

1.3.2. Analyses de laboratoire

Bactériologie

Le suivi bactériologique des hémimamelles inoculées a été réalisé par culture conventionnelle et qPCR.

Pour la culture, les échantillons de lait ont étéensemencés sur des milieux de culture en gélose.

En parallèle, la quantité de bactéries a été mesurée par qPCR multiplex à l'aide d'une approche moyen débit en plaques 384-puits à l'aide du ViiA7 Real-Time PCR System®. L'ADN a été extrait à partir de la fraction cellulaire du lait à l'aide d'un robot d'extraction pour acides nucléiques (Biosprint 96). La qPCR a été réalisée avec l'aide des amorces StaphR et StaphF, d'une sonde Staphprobe FAM BHQ-1 et du mix pour PCR Quantifast Master Mix (Qiagen). Pour déterminer la concentration de la bactérie *S. aureus*, les résultats de la PCR ont été comparés à une gamme étalon de référence, établie au préalable à partir d'échantillons dont la concentration en *S.aureus* SA9A était connue. Un contrôle positif a été réalisé par incorporation d'une quantité connue d'un plasmide bactérien dans les échantillons, dans le but de vérifier l'absence d'inhibition de la PCR.

Analyses de la réponse immunitaire

La détermination des CCS dans l'hémimamelle inoculée au cours de l'essai a été réalisée à l'aide du compteur Delaval DCC®. Lorsque la valeur de la CCS excédait 2000 cel/µL, le lait était dilué au dixième à l'aide d'une solution anticoagulante, puis à nouveau mesurée pour améliorer la précision de la mesure. La dilution était répétée jusqu'à ce que la valeur lue soit située dans l'intervalle de mesure et donc exploitable.

Le typage des leucocytes du lait a été réalisé par cytométrie en flux. Après centrifugation du lait, la crème et le lactosérum étaient écartés afin de conserver le culot cellulaire. Des marqueurs fluorescents se liant aux acides nucléiques ont été ajoutés à la solution pour différencier les types cellulaires. L'acquisition à l'aide de la cytométrie en flux était ensuite réalisée à l'aide d'un automate Miltenyi MACSQuant®. Enfin, l'analyse des données obtenues était réalisée à l'aide du logiciel FlowJo® pour connaître la formule leucocytaire du lait.

1.3.3. Date de mesure et répartition des analyses

Toutes ces étapes n'ont pas été réalisées pour toutes les dates de prélèvement : la répartition des différents examens et analyses effectués durant l'expérimentation est synthétisée dans le tableau suivant (**Tableau 4**).

Tableau 4: Examens et analyses effectués à chaque point de contrôle

2 Hm : réalisé sur les 2 héli-mamelles,

Hm I : réalisé sur l'héli-mamelle inoculée ou à inoculer (si avant T0).

Date	Points de contrôle	Production	SCM	CCS	CL (TB, TP, Urée, CCS)	Type de leucocytes	Culture	qPCR
10/01	T-296	2 Hm		2 Hm				
11/01	T-280	2 Hm					2 Hm	
	T-272	2 Hm						
13/01	T-232	2 Hm						
	T-224	2 Hm						
15/01	T-176	2 Hm			2 Hm			
16/01	T-160	2 Hm	2 Hm	2 Hm	2 Hm			
18/01	T-112	2 Hm	2 Hm	2 Hm			2 Hm	
	T-104	2 Hm			2 Hm			
19/01	T-88	2 Hm			2 Hm			
22/01	T-16	2 Hm	2 Hm	Hm I			2 Hm	Hm I
23/01	T0 inoculation		2 Hm	Hm I		Hm I		Hm I
	T4		2 Hm	Hm I				Hm I
	T8	2 Hm	2 Hm	2 Hm			Hm I	Hm I
	T12		2 Hm	Hm I		Hm I		Hm I
	T16	2 Hm	2 Hm	Hm I	2 Hm			Hm I
	T20		2 Hm	Hm I				Hm I
24/01	T24		2 Hm	Hm I		Hm I	Hm I	Hm I
	T28		2 Hm	Hm I	2 Hm			Hm I
	T32	2 Hm	2 Hm	Hm I				Hm I
	T36		2 Hm	Hm I				Hm I
	T40	2 Hm	2 Hm	Hm I				Hm I
	T44		2 Hm	Hm I				Hm I
25/01	T56	2 Hm	2 Hm	Hm I		Hm I	Hm I	Hm I
	T64	2 Hm	2 Hm	Hm I	2 Hm			Hm I
26/01	T80	2 Hm	2 Hm	Hm I	2 Hm			Hm I
	T88	2 Hm	2 Hm	Hm I				Hm I
27/01	T104	2 Hm	2 Hm	Hm I				Hm I
28/01	T128	2 Hm	2 Hm	Hm I				Hm I
29/01	T152	2 Hm	2 Hm	Hm I		Hm I		Hm I

1.4. Analyse des données

1.4.1. Mise en forme de la production journalière par hémi-mamelle

La production laitière journalière individuelle pour chaque hémi-mamelle a été convertie en pourcentage de la production laitière de référence de chaque brebis, que l'on nommera production journalière relative. Cette dernière correspond à la moyenne de la production journalière de la brebis pour les quatre jours précédents l'inoculation.

Exemple : pour une hémi-mamelle, une brebis a produit 1,5L, 1,3L, 1,5L et 1,7L, à J-4, J-3, J-2 et J-1 respectivement. La production de référence (moyenne de ces valeurs) est donc de 1,5L. Si 2 jours après inoculation (soit J2), cette hémi-mamelle produit 1L, on notera que la production journalière de cette hémi-mamelle à J2 est à hauteur de 66 % ($=1/1,5$) de la production de référence.

Cette opération permet de s'affranchir des différences inter-individuelles en terme de production laitière et a permis de comparer l'évolution de la production d'une brebis à l'autre.

1.4.2. Score clinique mammaire

Le Score Clinique Mammaire (SCM) a été établi pour chaque hémi-mamelle en prenant en compte les paramètres évalués lors de l'examen de la mamelle. Une note de 0, 1, 2 ou 3 a été attribuée à chacun de ces paramètres, la somme de ces notes correspondant au SCM sur 12. La règle de notation de chaque paramètre est présentée dans le **Tableau 5**. Par exemple, en cas de présence d'un seul abcès centimétrique (taille de 1cm au minimum) ou de moins de 4 abcès infra-centimétrique (<1cm), le score était de 1 ; il était de 3 en cas d'abcédation importante de la mamelle (plusieurs abcès centimétriques ou plus de 4 abcès infra-centimétriques palpables).

Tableau 5: Évaluation du score clinique mammaire

Score	Couleur	Douleur	Chaleur	Induration	Gonflement	Abcès	Volume des NL	Modifications du lait
0	normale	absente	absente	absente	absent	absence	normal	normal
1	anormale	présente	présente	présente	présent	1 abcès cm ou <4 abcès mm	augmentation modérée	couleur ou consistance anormale
2							augmentation sévère	couleur et consistance anormales
3						>1 abcès cm ou \geq 4 abcès mm		

1.4.3. Transformation des CCS en SCS

Une transformation logarithmique des CCS en SCS (Score de Cellules Somatiques) a été réalisée selon la formule suivante :

$$SCS = 3 + \log_2 \frac{CCS}{10^5}$$

Le but de cette opération est de normaliser la distribution des CCS, notamment afin de mieux répondre aux conditions d'application de certains tests statistiques.

1.4.4. Score Histologique

Un Score Histologique (SH) a été établi à partir des lésions microscopiques observées. Une note de 0 à 2 a été attribuée pour différents critères à chaque hémimamelle comme présenté dans le **Tableau 6**. Le SH n'a été établi que pour les hémimamelles inoculées examinées (n=12) ; l'analyse semi quantitative autorisée par cette notation n'est donc utilisée que pour rechercher les différences entre les brebis C/C et T/T. La comparaison entre les hémimamelles testées et témoins repose donc seulement sur des observations qualitatives.

Tableau 6: Évaluation du score histologique

Score	Abcès	Suppuration	Infiltration lymphoplasmocytaire	Fibrose	Nœud lymphatique
0	absents	absente	absente	absente	normal
1	rare	légère	légère	légère	réactionnel
2	nombreux	marquée	marquée	marquée	

1.4.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Graphpad Prism 6®. Pour analyser les paramètres évoluant dans le temps, une ANOVA à deux niveaux a été réalisée. Les données ponctuelles ont été analysées à l'aide d'un test de Student apparié. En cas de données manquantes ou de séries de données dont l'effectif était insuffisant, un test de Mann-Whitney a été effectué. Enfin, la comparaison des proportions des types leucocytaires a été réalisée avec un test de Khi 2.

2. Résultats

Dans un premier temps, nous nous attacherons à qualifier la réaction inflammatoire consécutive à l'inoculation en comparant hémi-mamelle inoculée et hémi-mamelle non inoculée pour l'ensemble des brebis. Ensuite, nous rechercherons d'éventuelles différences phénotypiques entre les deux groupes de brebis pour mettre en évidence les effets de la mutation de SOCS2.

2.1. Analyse de la réaction inflammatoire consécutive à l'inoculation

Ce paragraphe a pour but de qualifier l'infection mammaire obtenue après l'inoculation des bactéries dans une hémi-mamelle, indépendamment de leur génotype, et de la caractériser d'un point de vue clinique, biologique et lésionnel.

2.1.1. *Caractères cliniques*

La **production laitière brute** des hémi-mamelles inoculées diminue dans les jours qui suivent l'inoculation : la production de l'hémi-mamelle inoculée passe de 902 mL/j en moyenne avant inoculation à 534 mL/j après inoculation, tandis que l'hémi-mamelle non inoculée produit en moyenne 774 mL/j avant inoculation et 700 mL/j après.

La **production relative journalière** des hémi-mamelles inoculées passe ainsi de 100 % à 40 % de la production de référence en 5 jours (**Figure 11**). La production de l'hémi-mamelle controlatérale diminue aussi, mais dans une moindre mesure pour atteindre en moyenne 73 % de la production de référence à J5. La production relative journalière de l'hémi-mamelle inoculée est significativement plus faible que celui de l'hémi-mamelle non inoculée à J2 (ANOVA à 2 niveaux, $p < 0,0001$), J3 ($p < 0,01$) et J5 ($p < 0,01$). Alors que la production laitière est stable durant les trois premiers jours après l'inoculation, elle diminue de façon très significative dans la glande inoculée. L'analyse statistique met en évidence l'effet significatif du temps ($p < 0,0001$), de l'inoculation ($p = 0,004$) et de l'interaction des deux variables ($p = 0,02$) sur la production laitière. Ces résultats montrent que l'IIM est responsable de la chute de la production laitière.

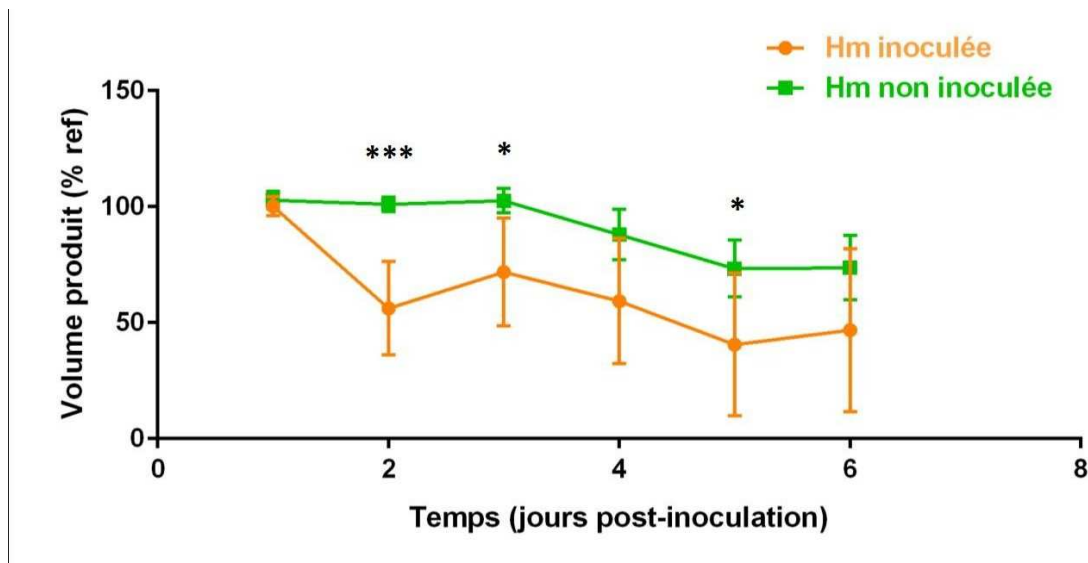


Figure 11: Évolution de la production laitière relative journalière par héli-mamelle
 Analyse statistique : ANOVA à 2 niveaux

Les résultats des examens cliniques mammaires sont présentés sous forme de SCM dans la **Figure 12**. Les SCM des deux héli-mamelles ne sont pas différents en début d'évolution et jusqu'à 24 heures post-inoculation. Au delà, le SCM de l'héli-mamelle inoculée augmente pour atteindre une valeur de 5,8/12 en moyenne lors des derniers points de contrôle, tandis que celui de l'héli-mamelle contro-latérale varie peu. La différence d'expression clinique observée est significative à partir de 56h post-inoculation. L'analyse statistique montre l'effet significatif de l'inoculation ($p=0,002$), du temps ($p<0,0001$) et de l'interaction des deux ($p<0,0001$) sur la variation du SCM..

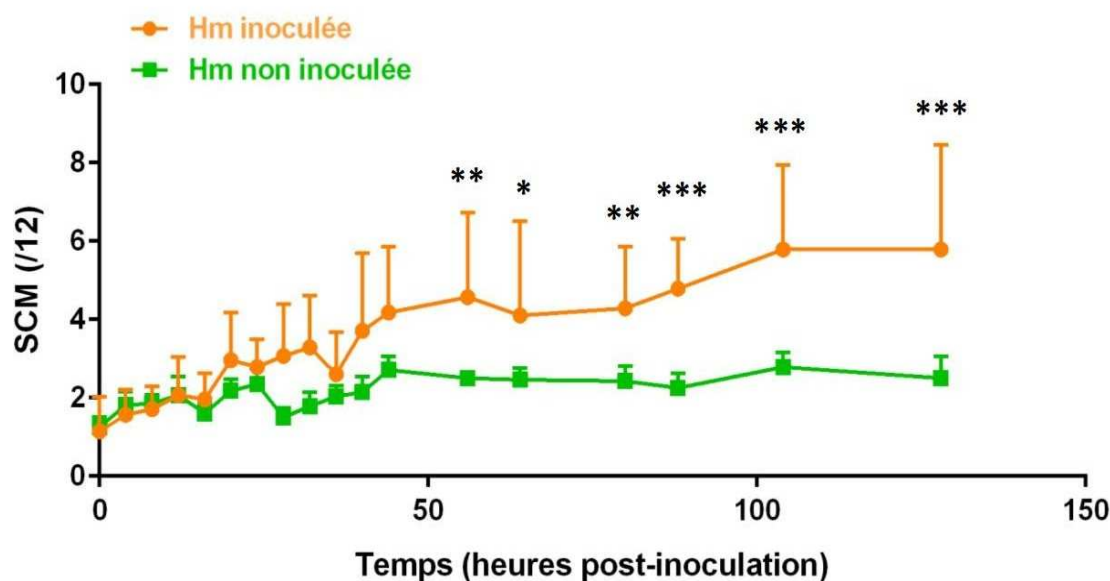


Figure 12: Évolution du score clinique mammaire de chaque héli-mamelle
Analyse statistique : ANOVA à 2 niveaux

2.1.2. Caractères biologiques

L'inflammation des deux héli-mamelles a été comparée en utilisant les résultats des CCS (et SCS) issus du CIAL SO aux différentes dates (**Figure 13**).

Avant inoculation, la moyenne des CCS des héli-mamelles témoins, comprise entre 640 000 cel/mL et $2,5 \times 10^6$ cel/mL (SCS de 4,37 à 6,23), est supérieure à celle des CCS des mamelles choisies pour être inoculées, qui varie de 131 000 cel/mL à 495 000 cel/mL environ (SCS de 3,06 à 4,04). Ces différences sont significatives statistiquement (Mann-Whitney, $p < 0,001$ à 176 heures post-inoculation (hpi), $p < 0,01$ à 160 hpi et 104 hpi).

Après l'inoculation, la réaction inflammatoire et immunitaire, caractérisées par l'augmentation des CCS dans le lait, est significativement supérieure dans l'héli-mamelle inoculée par rapport à l'héli-mamelle non inoculée, et ce dès la 1ère date du contrôle laitier post-inoculation réalisé (Mann-Whitney, $p < 0,001$ à 16 hpi et 64 hpi, $p < 0,05$ à 32 hpi et 80 hpi). Un maximum de $2,7 \times 10^7$ cel/mL en moyenne est atteint pour les hémimamelles inoculées 32h après infection, soit un SCS de 7,76, avant de diminuer à nouveau.

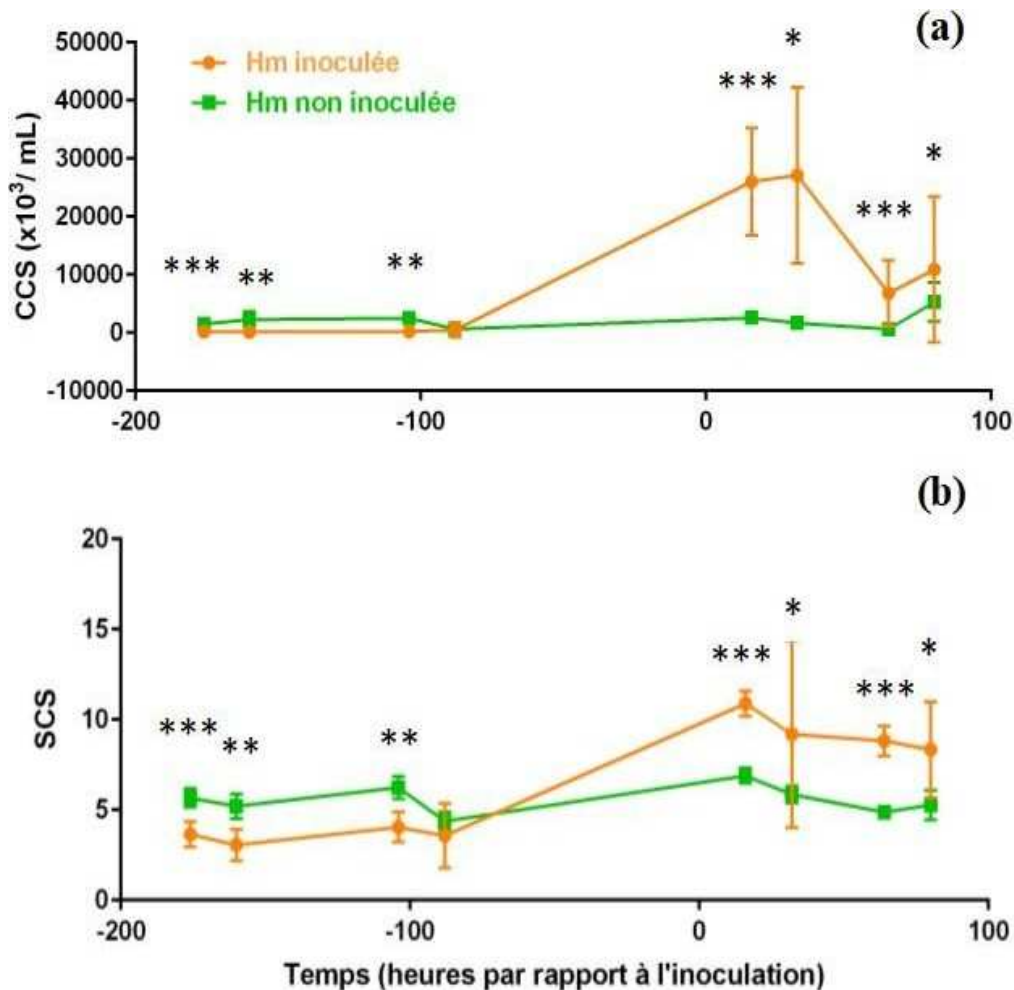


Figure 13: Évolution des taux cellulaires de chaque héli-mamelle

(a) Evolution des CCS,

(b) Evolution des SCS

Analyse statistique : Mann-Whitney

Les contrôles laitiers ont également permis un suivi des taux protéique, butyreux et de l'urée au cours de l'expérimentation (**Annexe 2**). Aucune tendance claire ne se dégage de ces données, malgré certaines différences significatives mises en évidence par le test de Mann-Whitney.

2.1.3. Caractères lésionnels

L'autopsie des brebis réalisée en fin d'expérimentation a permis de mettre en évidence des lésions de mammite subaiguë à chroniques telles qu'une augmentation du volume et de la consistance (**Figure 14a**), la présence de fibrine dans la citerne (**Figure 14b**), un aspect nécrotico-hémorragique (**Figure 14c**), ou encore la présence d'abcès (**Figure 14d**) sur plusieurs hémimamelles infectées.

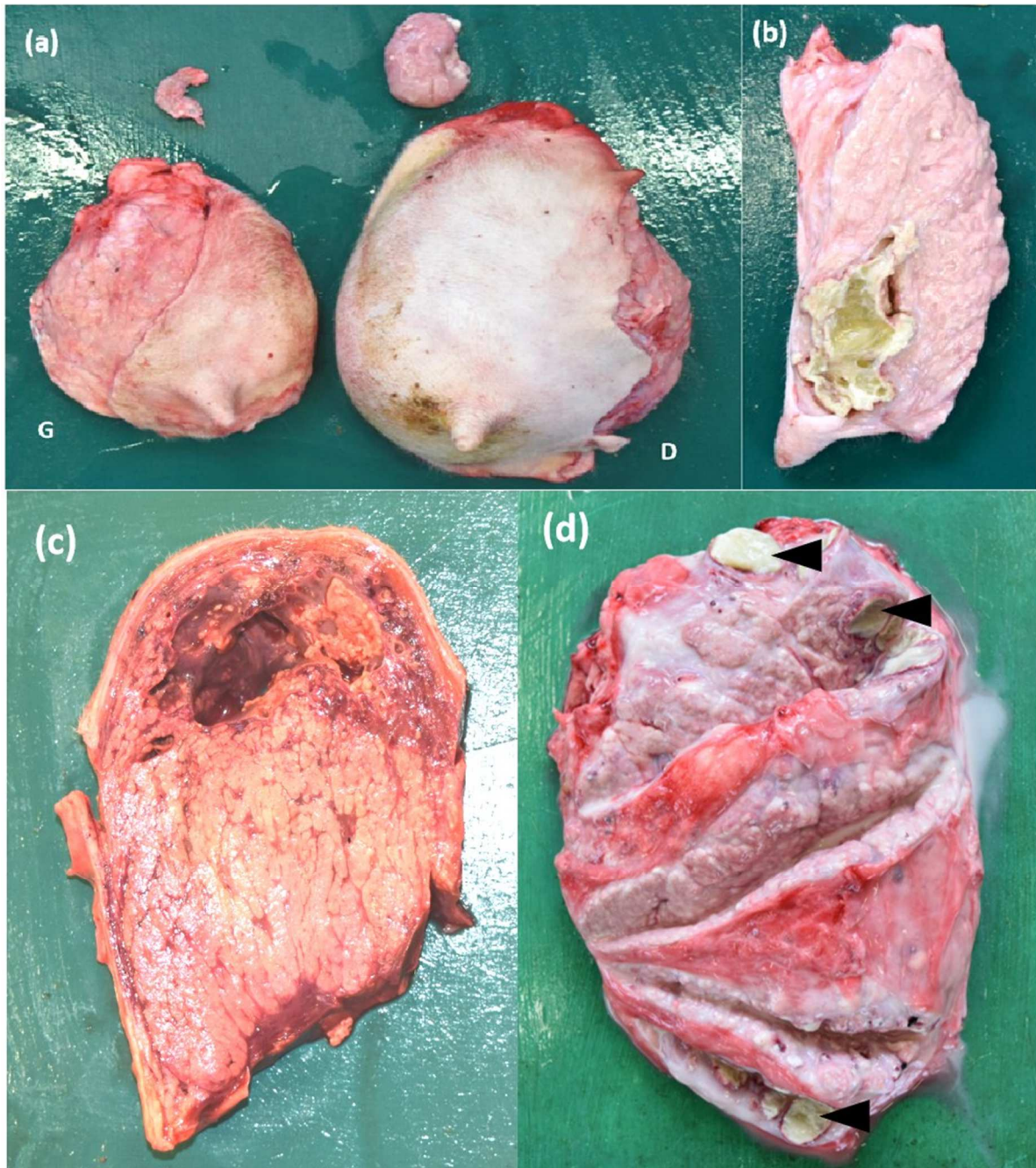


Figure 14: Lésions macroscopiques observées sur les héli-mamelles inoculées

- (a) augmentation de volume / consistance,
- (b) fibrine dans la citerne,
- (c) congestion et nécrose,
- (d) abcès (flèches noires)

Environ 79 % (soit 11/14) des héli-mamelles inoculées ont un volume et/ou une consistance augmentés, 21 % (3/14) présentaient une atteinte congestivo-nécrotique, 79 % (11/14) contenaient de la fibrine dans la citerne, et 71 % (10/14) présentaient des abcès inclus dans le parenchyme. Les seuls signes lésionnels des héli-mamelles non inoculées, observés dans 14 % (2/14) d'entre elles, étaient une augmentation de la consistance (**Annexe 3**).

Les variations de volume et de consistance observées sur les hémimamelles inoculées étaient associées à une différence significative (paired t-test, $p=0,003$) entre les poids des hémimamelles inoculées (1016 g en moyenne) et celui des hémimamelles non inoculées (528g en moyenne), comme le montre la **Figure 15**. Cette tendance a aussi été observée pour les nœuds lymphatiques mammaires, avec en moyenne un poids de 24,1g pour les hémimamelles inoculées contre 9,5g pour les hémimamelles non inoculées (paired t-test, $p= 0,0007$) (**Figure 15**).

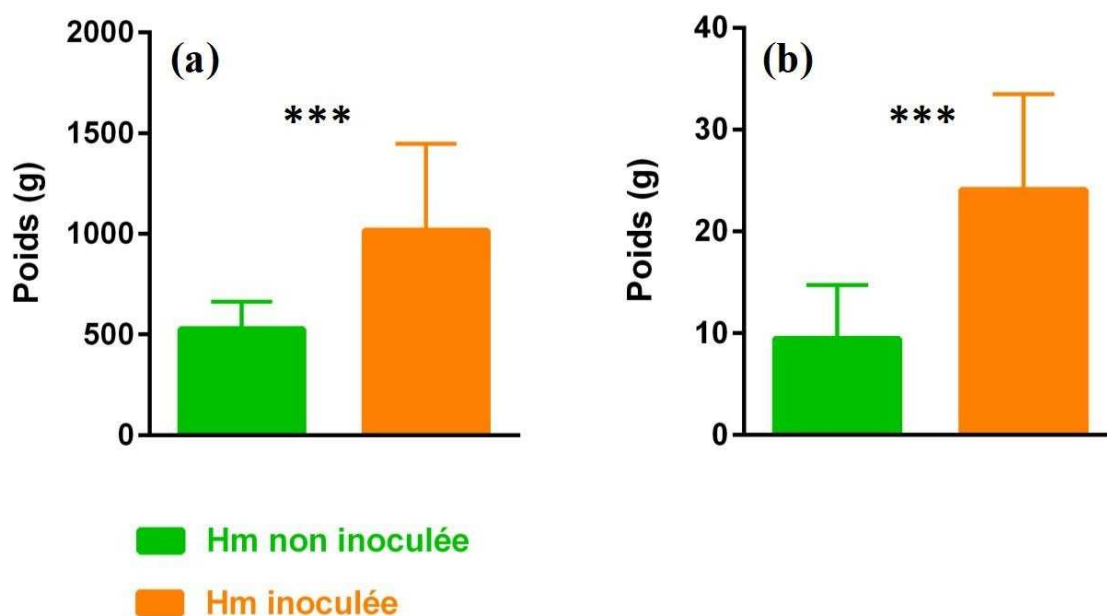


Figure 15: Poids des hémimamelles et des nœuds lymphatiques : comparaison des hémimamelles inoculées et non inoculées

(a) Poids des hémimamelles,
 (b) Poids des nœuds lymphatiques

Analyse statistique : Paired t-test

L'examen microscopique des hémimamelles inoculées a mis en évidence des lésions de mammites subaiguë à chroniques dans le parenchyme, avec notamment (en intensité variable),

- une suppuration alvéolaire et/ou canalaire (**Figure 16 a et b**) dans 67% des cas (8/12)
- une infiltration lympho-plasmocytaire interstitielle voire en follicules (**Figure 16 c**) dans 92 % des cas (11/12),
- des abcès (**Figure 16 d**) dans 58 % des cas (7/12),
- de fibrose interstitielle associée à une métaplasie canalaire (**Figure 16 e et f**) dans 67 % des cas (8/12).

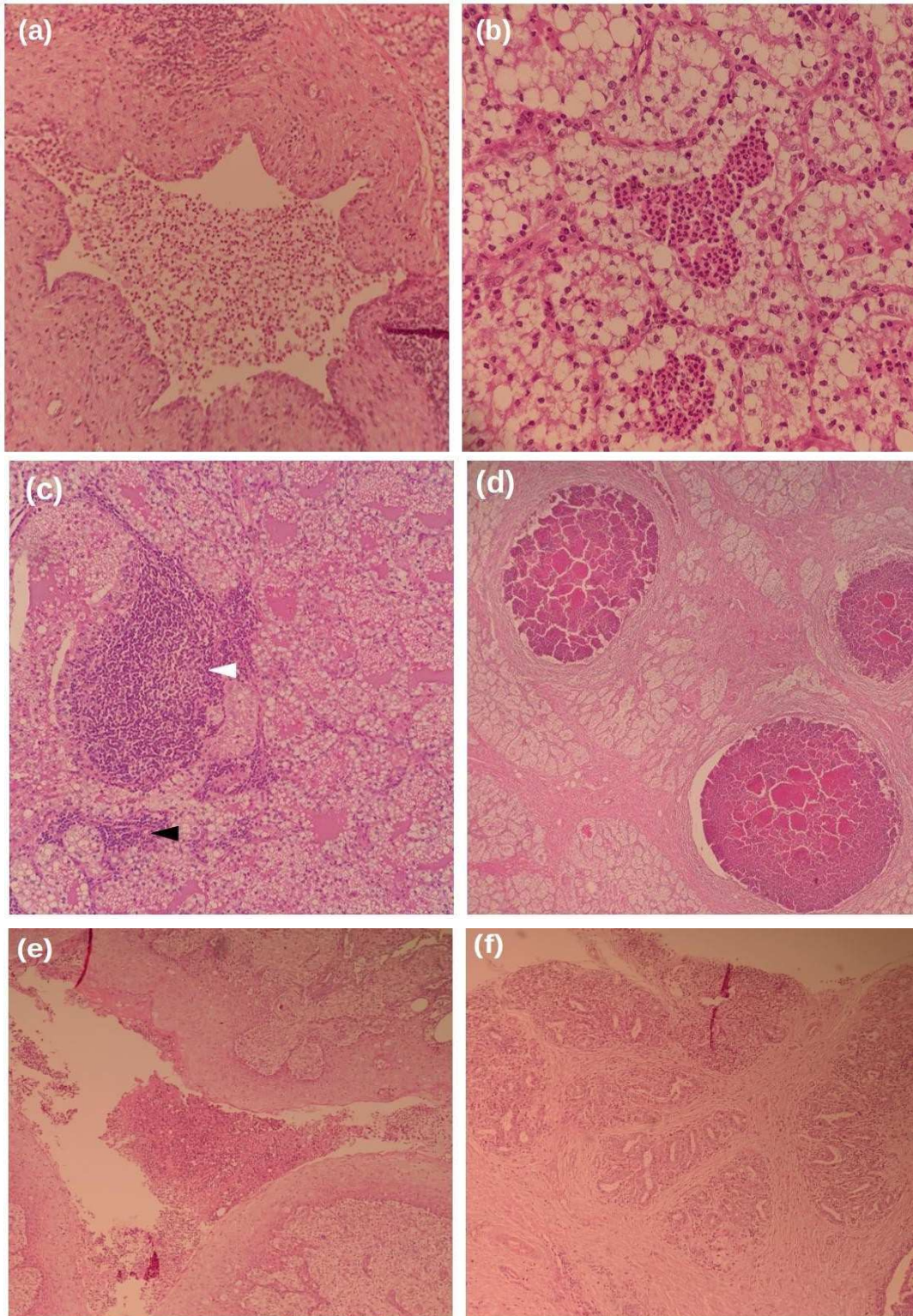


Figure 16: Coupe histologiques d'hémi-mamelles inoculées

(a) Suppuration canalaire, X100, HE

(b) Suppuration alvéolaire, X400, HE

(c) Follicule lymphocytaire (flèche blanche) et infiltrat lympho-plasmocytaire (flèche noire), X100, HE

(d) Abscès multiples, X40, HE

(e) Métaplasie canalaire sévère avec suppuration, X40, HE

(f) Fibrose interstitielle marquée, X40, HE

Dans des cas plus rares (2/12), des lésions de nécrose ont été observées.

Les seules lésions microscopiques observées sur certaines coupes d'hémi-mamelles non inoculées étaient une suppuration (29 % soit 2/7) et une infiltration lympho-plasmocytaire interstitielle modérée (29 % soit 2/7).

De plus, les nœuds lymphatiques des hémi-mamelles inoculées étaient réactionnels dans 92 % des cas (12/13) comme en témoigne l'hyperplasie corticale, para-corticale et plasmocytaire observée. Du côté non inoculé, les nœuds lymphatiques étaient réactionnels dans 46 % des cas (6/13).

L'ensemble des résultats de l'examen histologique est synthétisé dans l'**Annexe 4**.

Conclusion : Avant l'inoculation, les caractéristiques cliniques (i.e. production relative, SCM), et biologiques (i.e. CCS) diffèrent peu selon l'hémimamelle considérée. Après inoculation, les hémimamelles inoculées sont cliniquement plus atteintes à partir de 24h post-inoculation. Elles présentent également une augmentation importante de leur CCS dès 16h après inoculation, pour atteindre 27 millions de cellules/mL en moyenne 32h après inoculation, contrairement aux mamelles non inoculées. L'examen nécropsique a montré une atteinte lésionnelle sévère des hémi-mamelles inoculées, caractérisée par une augmentation de volume, de consistance de la glande, la présence de congestion et de nécrose, de fibrine et d'abcès. L'histologie a confirmé l'atteinte lésionnelle marquée des hémi-mamelles inoculées.

2.2. Caractérisation phénotypique de la réaction immunitaire et effet de la mutation de SOCS-2

Cette partie a pour objectif la détection des différences phénotypiques en terme de réponse inflammatoire mammaire entre les deux groupes génétiques de brebis en fonction du génotype *Socs2*, d'un point de vue clinique, biologique et lésionnel.

2.2.1. Caractères cliniques

La production laitière relative des deux groupes diminue au cours du temps de façon similaire, quelle que soit l'hémi-mamelle considérée (**Annexe 5**). Aucune différence significative n'a été mise en évidence.

Les SCM des deux groupes augmentent de façon similaire au cours de l'infection (**Figure 17**), excepté lors des examens cliniques à 56 et 64h après inoculation où les brebis de génotype sauvage ont un SCM moyen inférieur à celui des brebis porteuses de la mutation. Cette différence est très significative entre les deux groupes à 64 hpi ($p < 0,001$). Pour les autres dates, les deux seules sources de variations significatives du SCM selon l'analyse statistique sont le temps ($p < 0,0001$) et les différences inter-individuelles ($p < 0,001$) contrairement au génotype.

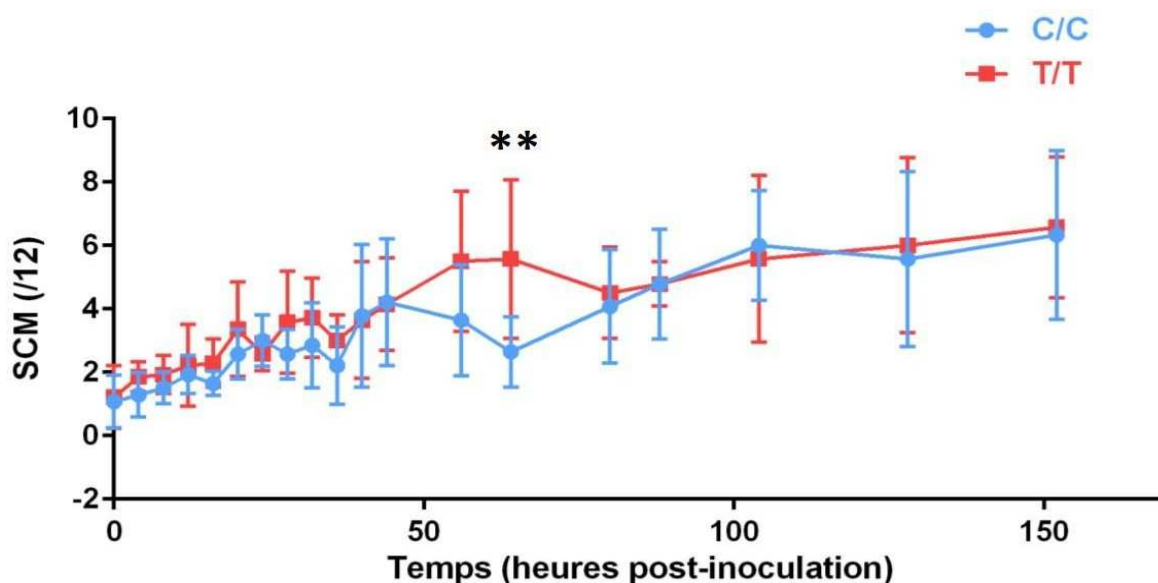


Figure 17: Évolution du score clinique mammaire moyen des brebis de génotype sauvage (C/C) et de celles porteuses de la mutation de *Socs2* (T/T)
Analyse statistique : ANOVA à 2 niveaux

2.2.2. Caractères biologiques

Bactériologie

La **culture bactérienne conventionnelle** montre un titre en *S. aureus* avoisinant les 5×10^5 ufc/mL 8h après l'inoculation (**Figure 18 a**). Il diminue au cours du temps, mais seuls échantillons issues des brebis de génotype sauvage sont stériles à 56 hpi. Cependant, aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence.

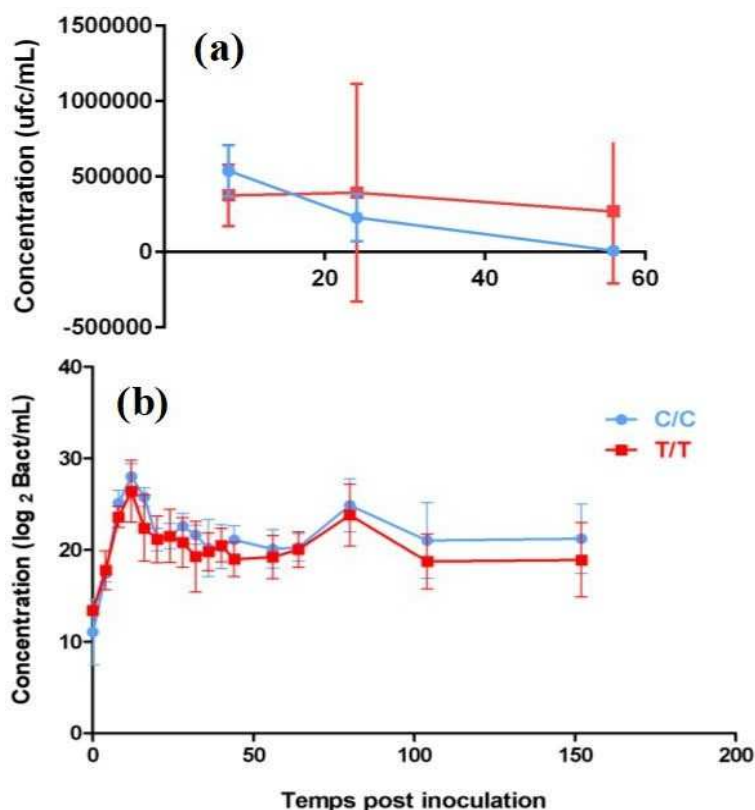


Figure 18: Évolution de la concentration moyenne en *S. aureus* par culture conventionnelle (a) et qPCR (b) dans le lait selon le génotype des brebis

C/C : brebis de génotype sauvage ; T/T : brebis porteuses de la mutation de *Socs2*

Analyse statistique : ANOVA à 2 niveaux

L'analyse de la charge bactérienne dans le lait réalisée par **qPCR** révèle deux pics de la concentration en *S. aureus* dans le lait à 12 et 80h après l'inoculation pour les brebis des deux génotypes, atteignant $3,96 \times 10^8$ bact/mL et $1,39 \times 10^8$ bact/mL respectivement pour les brebis de génotype sauvage et $2,20 \times 10^8$ bact/mL et $6,40 \times 10^7$ bact/mL respectivement pour les brebis porteuses de la mutation de *SOCS-2* (**Figure 18 b**). Le titre en *S. aureus* des brebis avec la mutation reste inférieur à celui des brebis de génotype sauvage, bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative. Par ailleurs, l'analyse statistique ne met en évidence aucun effet du génotype sur la variation du titre bactérien dans le lait, seul le temps est un facteur de variation significatif ($p < 0,0001$).

Réponse immunitaire de l'hôte

L'examen des CCS montre une augmentation de la réponse inflammatoire cellulaire dans l'hémi-mamelle inoculée en deux pics à 24 et à 88 hpi (**Figure 19 a**). Les CCS des brebis de génotype sauvage sont plus élevées que celles des brebis porteuses de la mutation, mais la différence n'est significative qu'à 24 hpi ($p < 0,0001$). En revanche, aucune différence entre les deux groupes n'est significative pour les SCS (**Figure 19 b**). L'analyse statistique montre que les causes significatives de variation sont le temps ($p < 0,0001$) et le facteur inter-individuel ($p = 0,02$).

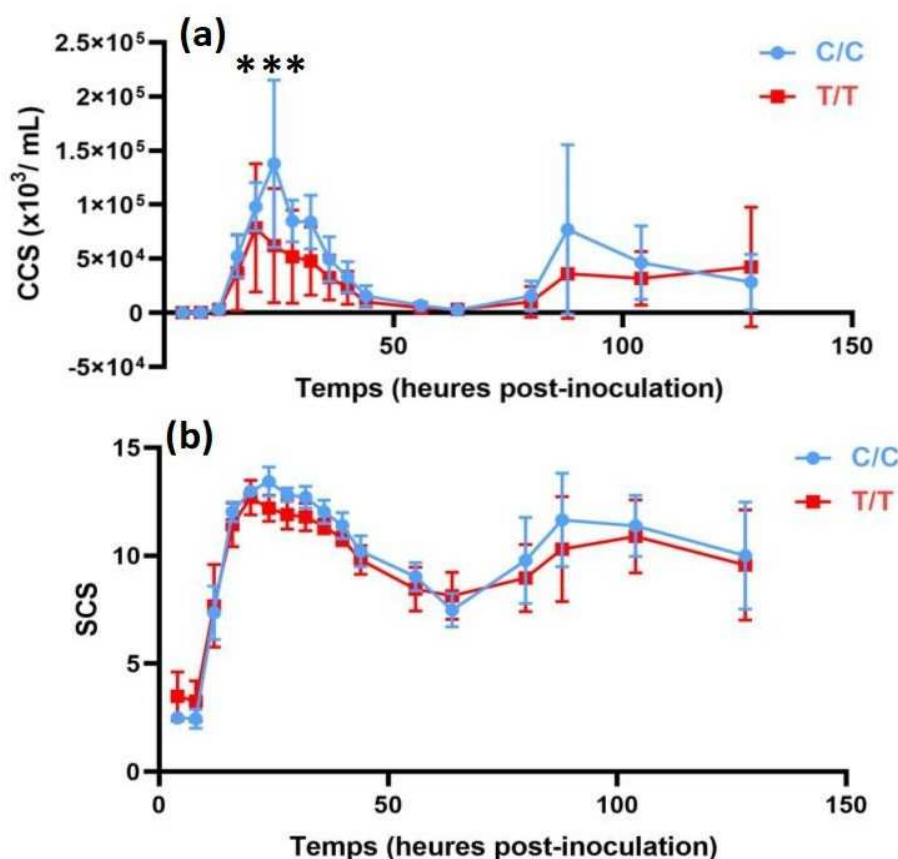


Figure 19: Évolution des CCS (a) et SCS (b) de l'hémi-mamelle inoculée en fonction du génotype des brebis

C/C : brebis de génotype sauvage ; T/T : brebis porteuses de la mutation de *Sox2*

Analyses statistiques : ANOVA à 2 niveaux

L'évolution des populations leucocytaires du lait au cours du temps est présentée dans la **Figure 20**. Pour chacune d'entre elles, un pic est observé 24h après l'inoculation avant de diminuer et de se stabiliser. Vingt-quatre heures après inoculation, le lait des brebis de génotype sauvage contient significativement plus de lymphocytes (Mann-Whitney, $p = 0,0023$) et de monocytes/macrophages (Mann-Whitney, $p = 0,011$).

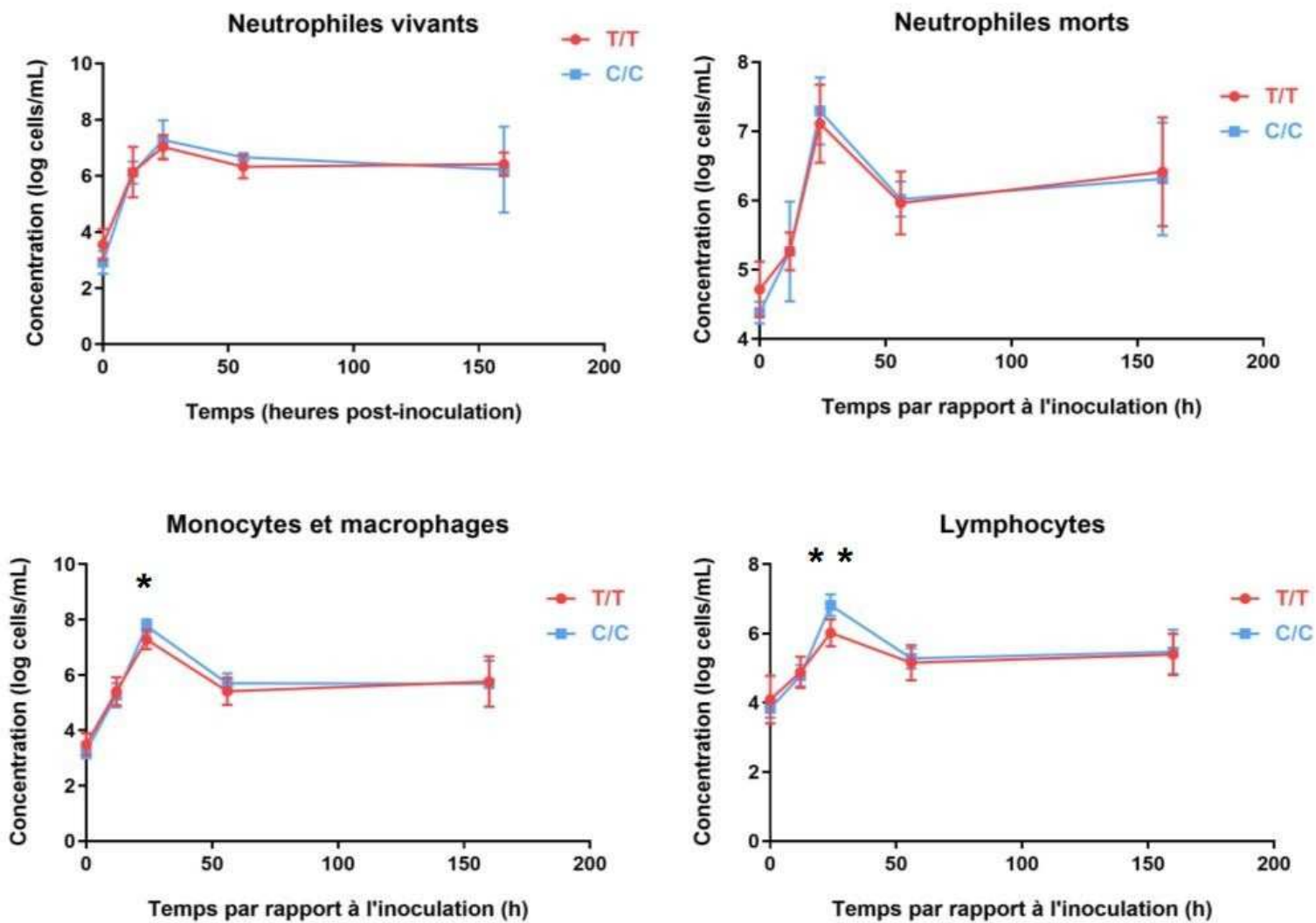


Figure 20: Évolution des populations leucocytaires du lait en fonction du génotype des brebis

C/C : brebis de génotype sauvage ; T/T : brebis porteuses de la mutation de *Socs2*

Analyses statistiques : Mann-Whitney

Les proportions respectives de chaque sous-population leucocytaire varient de façon importante au cours de l'infection chez les brebis des deux génotypes (**Figure 21**).

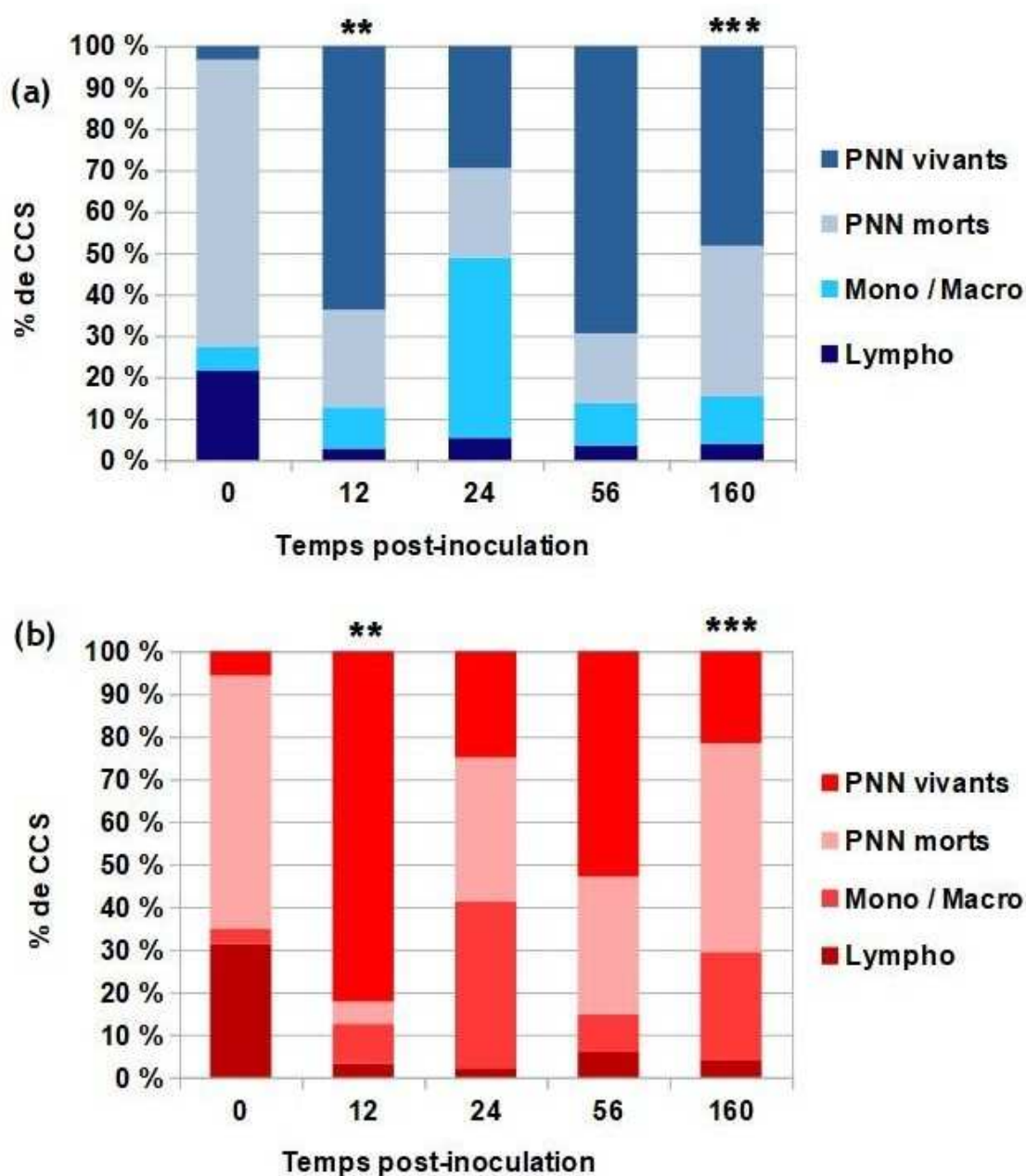


Figure 21: Évolution des proportions des sous-populations leucocytaires du lait selon le génotype des brebis

(a) brebis de génotype sauvage,

(b) brebis porteuses de la mutation de *Socs2*

PNN : polynucléaires neutrophiles, mono : monocytes, macro : macrophages, lympho : lymphocytes

Analyse statistique : test de khi-2

À T0, la population majoritaire quel que soit le génotype correspond aux neutrophiles morts (69 % pour les brebis de génotype sauvage, 59 % pour les brebis porteuses de la mutation), suivi des lymphocytes (22 et 31 % respectivement). Douze heure après l'inoculation, la proportion de neutrophiles vivants augmente et passe de 3 à 64 % chez les brebis de génotype sauvage et de 6 à 82 % chez les brebis porteuses de la mutation.

À 24 hpi, la proportion de neutrophiles vivants diminue à nouveau au profit des macrophages qui représentent alors 44 % des leucocytes chez les brebis de génotype sauvage et 39 % chez celles porteuses de la mutation. La réponse neutrophilique (neutrophiles vivants) semble plus forte chez les brebis porteuses de la mutation mais moins durable, comme l'indique une différence de proportions à 152 hpi (48 % pour les brebis de génotype sauvage contre 21 % chez les brebis porteuses de la mutation). Les formules leucocytaires des deux groupes sont significativement différentes à 12 hpi (Khi 2, p=0,0021) et 152 hpi (Khi 2, p=0,0004).

2.2.3. Caractères lésionnels

Des lésions similaires ont été observées chez les deux groupes de brebis (**Tableau 7**). Les lésions prédominantes étaient une augmentation du volume et de la consistance, la présence de fibrine dans la citerne ainsi que le développement d'abcès dans le parenchyme de l'hémi-mamelle inoculée. Les seules différences apparentes entre les brebis des deux génotypes est la présence d'une congestion marquée et d'un début de nécrose chez 3 brebis porteuses de la mutation, et le développement d'abcès chez toutes les brebis porteuses de la mutation contre seulement 3 brebis de génotype sauvage.

Tableau 7: Nombre de brebis de chaque génotype présentant des lésions macroscopiques
C/C : brebis de génotype sauvage ; T/T : brebis porteuses de la mutation de *Socs2*

Génotype	Volume / consistance augmentés		Congestion / nécrose		Fibrine		Abcès	
	Hm I	Hm NI	Hm I	Hm NI	Hm I	Hm NI	Hm I	Hm NI
C/C	5/7	0/7	0/7	0/7	6/7	0/7	3/7	0/7
T/T	6/7	2/7	3/7	0/7	5/7	0/7	7/7	0/7

Les héli-mamelles inoculées des brebis de génotype sauvage, pesant 904g en moyenne, sont moins lourdes que celles du second groupe – 1129g en moyenne (**Figure 22**). Cette tendance n'est pas vérifiée sur les héli-mamelles témoins, ce qui suggère une réaction inflammatoire plus marquée chez les brebis porteuses de la mutation de *Socs2*. Le poids moyen des nœuds lymphatiques mammaires des deux côtés sont similaires (23g pour les brebis de génotype sauvage et 25g pour les brebis porteuses de la mutation). Aucune de ces différences n'est significative.

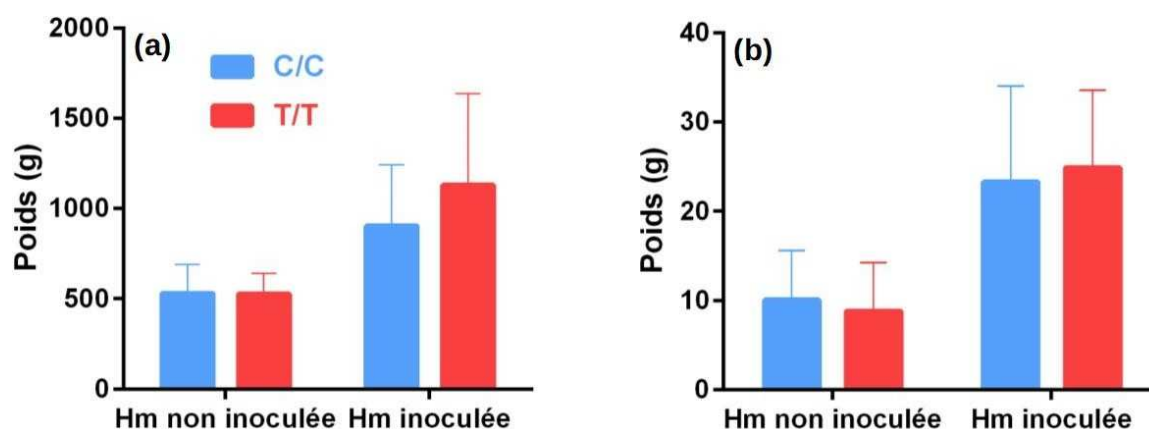


Figure 22: Poids moyens des héli-mamelles (a) et des nœuds lymphatiques (b) selon le génotype des brebis

C/C : brebis de génotype sauvage ; T/T : brebis porteuses de la mutation de *Socs2*

Analyse statistique : paired t-test

NB : Les effets de la mutation pR96C du gène *SOCS2* sur la croissance des animaux décrits dans de précédentes études (Greenhalgh et al. 2005; Vesterlund et al. 2011; Rupp et al. 2015) ont également été vérifiés : les radius, fémurs et tibias des brebis porteuses de la mutation étaient significativement plus long que ceux des brebis de génotype sauvage (**Annexe 6**).

Les scores histologiques des deux groupes sont présentées dans le **Tableau 8**. Les héli-mamelles inoculées des brebis porteuses de la mutation (SH=6,03) sont en moyenne plus atteintes que celles des brebis de génotype sauvage (SH=5,16), mais cette différence n'est pas significative statistiquement. On note la présence d'abcès et de lésions de fibrose plus marquée chez les brebis porteuses de la mutation que chez les brebis de génotype sauvage.

Tableau 8: Score histologique moyen des héli-mamelles inoculées des brebis des deux génotypes

C/C : brebis de génotype sauvage ; T/T : brebis porteuses de la mutation de *Socs2*

Génotype	Abcès	Suppuration alvéolaire ou canalaire	Infiltration lympho-plasmocytaire	Fibrose	Atteinte des nœuds lymphatiques	Score Histologique moyen
C/C	0,67/2	1,33/2	1,33/2	0,83/2	1/1	5,16/9
T/T	1,5/2	1/2	1/2	1,67/2	0,86/1	6,03/9

Conclusion : Les SCM des brebis de génotype sauvage ne sont significativement inférieurs à ceux des brebis porteuses de la mutation qu'à 24 hpi. Si les titres en *S.aureus* du lait obtenus ne diffèrent pas entre les deux groupes, les brebis de génotype sauvage présentent des CCS supérieures à celles du second groupe à 24 et 88 hpi, mais seule la différence à 24 hpi est significative. Les neutrophiles sont la principale sous-population leucocytaire présente après inoculation dans les deux groupes et persiste de façon plus marquée chez les brebis de génotype sauvage. Les formules leucocytaires sont significativement différentes à 24 hpi, avec des macrophages et lymphocytes plus nombreux chez les brebis de génotype sauvage que chez les brebis porteuses de la mutation, et à 152 hpi où la réponse neutrophilique persiste de façon plus importante chez les brebis de génotype sauvage. D'un point de vue lésionnel, les brebis porteuses de la mutation semblent plus atteintes que les autres, avec un degré d'abcédation des héli-mamelles inoculées plus élevé, que ce soit à l'échelle macroscopique ou microscopique.

3. Discussion

3.1. Intérêt de l'étude

3.1.1. *La place de la sélection des races dans la prévention des mammites*

Dans le contexte actuel du plan national de réduction des risques d'antibiorésistance et de l'utilisation des antibiotiques Ecoantibio 2 (2017-2021), de moins en moins d'antibiotiques sont utilisés pour soigner les mammites chez les ruminants, l'espèce ovine incluse (DGAL 2017). La sélection d'animaux plus résistants aux mammites s'inscrit pleinement dans cette démarche. La diminution de l'incidence et de la sévérité des mammites permettrait de réduire l'utilisation d'antibiotiques, sans dégradation de la production, de la qualité du lait, et de la santé de la mamelle. Ce dernier point est primordial pour assurer la rentabilité économique de l'intégration de ce caractère dans les schéma de sélection.

Dans le cas des mammites à *Staphylococcus aureus* notamment, l'apparition de résistances rend le traitement des mammites difficile, parfois inefficace (Bourély et al. 2019; Résapath 2019). Les pertes économiques pour l'éleveur peuvent être élevées. La sélection d'animaux résistants aux IIM constitue donc une alternative aux traitements antibiotiques pour une meilleure prévention des mammites.

Enfin, dans un contexte où la prise en charge thérapeutique des mammites cliniques est rare et partielle (souvent uniquement en cas d'atteinte systémique), la résistance des animaux vis à vis des mammites permet une amélioration sensible du bien-être animal, en diminuant l'incidence de mammites cliniques et la sévérité des symptômes.

3.1.2. *L'intérêt de l'étude du support génétique de la résistance aux mammites*

Avec l'avènement de la sélection génomique, la caractérisation du support génétique de la résistance aux mammites revêt un intérêt technologique : des gènes ayant un impact majeur sur ce caractère pourront éventuellement être intégrés dans le calcul des index génomiques des béliers et ainsi permettre une sélection plus poussée en ce qui concerne la santé de la mamelle.

La mutation ponctuelle R96C a été étudiée en caractérisant l'impact sur les fonctions de la protéine, à savoir son inactivation par modification de ses sites de liaison avec ses ligands (Rupp et al. 2015). De plus, divers caractères cliniques et de production ont été relevés chez des brebis de génotype *Socs2* divergent. Il a ainsi été observé une augmentation de la production, du poids et de la taille des individus, et des CCS chez les brebis porteuses de la

mutation. Ces données sont essentielles pour prédire l'impact d'une sélection sur ce gène sur les performances ultérieures des animaux de la race après sélection. L'objectif de la présente étude était de compléter ces informations en étudiant cette fois l'effet de cette mutation sur la réponse immunitaire dans un contexte d'infection mammaire.

3.2. Modalités de l'expérimentation

3.2.1. Les animaux

Cette expérimentation a été menée sur des brebis primipares de race Lacaune, sélectionnées et élevées au domaine expérimental de La Fage, en Aveyron. Les brebis sont un modèle animal d'intérêt pour la recherche lié à la production laitière des ruminants. Le choix de l'espèce et de la race pour cette étude est essentiellement lié au contexte de l'identification de la mutation R96C de SOCS-2 (Rupp et al. 2015) sur des animaux de la même race. De plus, cette mutation n'est pas retrouvée dans d'autres races, comme la Manech à tête Rousse (Oget et al. 2019), d'où l'importance d'analyser son effet sur des animaux de race Lacaune. Les brebis étaient toutes primipares et au même stade de lactation, ce qui permet de s'affranchir de deux facteurs (parité et stade de lactation) que l'on sait associés à des variations des CCS (Menzies et Ramanoon 2001; Bergonier et al. 2003; Paape et al. 2007; Souza et al. 2012). En outre, cela permet d'expérimenter sur des animaux dont la probabilité qu'ils soient sains est plus grande, par rapport à des animaux plus âgés ou à un stade de lactation plus tardif.

Les contraintes logistiques et les exigences génétiques et sanitaires de l'expérimentation n'autorisaient pas la constitution de groupes de plus grande taille. Ces effectifs réduits sont la principale limite de l'expérimentation, car ils engendrent un manque de puissance statistique limitant la robustesse des conclusions, comme en témoigne la significativité des différences inter-individuelles dans certains de nos résultats (SCM et CCS/SCS notamment).

3.2.2. L'inoculation

Trois brebis ont été inoculées alors que leur SCS étaient supérieurs à 3, donc pouvant être considérées comme potentiellement porteuses d'une mammites avant l'inoculation. Néanmoins, aucune infection clinique n'a été mise en évidence. Les examens bactériologiques effectués avant inoculation (culture et qPCR) montrent une contamination bactérienne qui reste faible (de l'ordre de 10^3 bact/mL) en comparaison aux concentrations retrouvées après infection (jusqu'à 2 à 4×10^8 bact/mL). Ces infections pré-inoculation ne constituent donc

probablement pas un biais majeur dans cette étude, notamment aux vues de l'évolution de l'infection après l'inoculation et la première partie des résultats obtenus : les différences significatives entre hémi-mamelles témoin et inoculée sont telles que la réaction inflammatoire observée après l'épreuve peut être considérée comme quasi-exclusivement imputable à l'infection expérimentale, comme attendu.

Les CCS dans l'hémi-mamelle témoin sont supérieures à celles dans l'hémi-mamelle testée avant l'infection expérimentale, ce qui s'explique par la façon dont les hémi-mamelles à inoculer ont été choisies (bactériologie et CCS les plus bas).

L'inoculation telle que réalisée dans le protocole de ce projet s'éloigne probablement des conditions naturelles de contamination de la mamelle, et ce pour deux raisons principales. L'inoculum a été préparé de sorte à ce que les staphylocoques inoculés soient en phase exponentielle de croissance, particulièrement propice à l'installation des bactéries dans un tissu. Ensuite, l'inoculation intra-citernale implique de passer outre les défenses structurelles de la mamelle, notamment constituées du canal du trayon, barrière importante bien que non suffisante contre les bactéries. Une alternative, consistant à tremper le trayon dans un bouillon de culture dont le titre en *S. aureus* serait connu, permettrait de déposer les bactéries sur la peau du trayon, et constituer ainsi un réservoir de staphylocoques à partir duquel se produit l'infection. Cela présente cependant de nombreuses contraintes. Les titres infectants sont aléatoires et inconnus, le moment de l'infection n'étant pas connu de l'expérimentateur *a priori*. La concentration des suspensions bactériennes utilisées en trempage doit être nettement supérieure à celle des inoculums comme réalisés dans cette étude si l'on souhaite déclencher une mammite clinique, sans mentionner les conditions sanitaires contraignantes qu'impose la manipulation de ces inoculums. Dans notre expérimentation, l'infection expérimentale par *S. aureus* devait être standardisée, efficace et déclencher des mammites cliniques afin que ces paramètres puissent être évalués pour caractériser phénotypiquement l'effet de la mutation de SOCS-2. Ces objectifs ont été remplis, avec une expression clinique des IIM chez toutes les brebis.

3.2.3. *Le suivi des animaux*

Les deux lots de brebis ont été conduits sans distinction de groupe tout au long de l'expérimentation : les animaux étaient hébergés dans le même parc, consommaient la même ration à base de fourrage et de concentrés ; aucun ordre de traite n'a été établi préalablement. Ainsi, la pression d'infection et les facteurs de risques environnementaux liés au logement et à l'alimentation ont été identiques pour toutes les brebis. Ils étaient suffisants pour prévenir

l'apparition d'infections concomitantes, même si deux brebis ont déclaré une mammite clinique avant l'inoculation et ont été écartées.

Chaque opérateur intervenant lors des prélèvements avait un rôle qui lui avait été désigné tout au long de l'expérimentation, permettant ainsi de limiter les effets liés à l'opérateur : les examens cliniques ont été réalisés par les deux mêmes opérateurs tout au long de l'essai, les prélèvements de lait pour bactériologie par deux autres, etc.

3.2.4. Les analyses

Utilisation de la production relative

Dans les études précédentes ayant étudié le SNP de *Socs2*, il a été montré que la mutation de *Socs2* était associée à une augmentation de la production laitière (Rupp et al. 2015; Oget et al. 2018). Cette observation a été faite sur les données d'une lactation entière. Notre expérimentation ne s'étendant que sur le premier mois de la 1ère lactation des brebis, il était difficile de vérifier cet effet de la mutation sur la production globale des brebis. C'est pourquoi nous avons choisi de calculer la production relative. Si elle nous empêche de vérifier la corrélation entre mutation de SOCS-2 et augmentation du volume de lait produit, elle permet en revanche de mieux apprécier l'évolution de la quantité journalière de lait produit par les brebis au cours de l'infection expérimentale. Sa baisse met en évidence la chute de production qui survient très souvent lors de mammite (Giadinis et al. 2012).

Utilisation de score clinique mammaire et score histologique

Les examens cliniques et l'examen histologique des mamelle et nœuds lymphatiques mammaires n'ont été réalisés que par deux opérateurs différents, ce qui limite les biais liés à l'opérateur. Ce sont néanmoins des examens qui restent en partie subjectifs. Pour exploiter au mieux les informations relevées lors du suivi, nous avons choisi l'utilisation de score clinique mammaire et histologique dont l'utilisation permet de quantifier l'atteinte clinique et lésionnelle de la mamelle de façon synthétique. Le calcul d'un tel score induit une perte de précision dans les données, essentiellement par le choix d'un nombre restreint de caractères évalués et par les modalités simplifiées de notation. Il en résulte néanmoins un résultat plus fiable car moins subjectif, dont le format numérique permet l'évaluation statistiques.

Mesures des CCS

L'utilisation du compteur Delaval DCC® pour l'évaluation des CCS du lait de brebis a été validée par de précédentes études publiées (Gonzalo et al. 2006). Si la composition du lait de brebis varie de celle du lait de vache pour lequel le compteur a été développé, il apparaît que la précision des mesures est très bonne, en particulier si le lait de brebis est dilué dans une solution tampon avant la mesure, pour les valeurs trop élevées.

Les valeurs CCS obtenues avec le compteur Delaval DCC® diffèrent de celles obtenus par le CIAL SO (**Tableau 9**).

Tableau 9: Comparaison des CCS moyennes des héli-mamelles inoculées de chaque groupe en fonction de la technique de comptage utilisée.

Temps de contrôle	Compteur Delaval DCC®		CIAL SO	
	T/T	C/C	T/T	C/C
T12	4,24E+06	2,83E+06		
T16	4,24E+07	5,48E+07	2,38E+07	2,82E+07
T24	6,32E+04	1,51E+08		
T32	4,74E+07	8,78E+07	2,71E+07	NA
T56	5,40E+06	7,21E+06		
T64	4,53E+06	2,58E+06	9,00E+06	4,98E+06
T80	9,47E+06	1,94E+07	5,11E+06	1,56E+07
T152	1,62E+07	1,88E+07		

Des différences parfois élevées sont observées. Plusieurs facteurs ont pu impacter les mesures. D'abord, certains prélèvements destinés au CIAL SO n'ont pu être réalisés à cause de la présence d'une agalactie clinique chez certaines brebis. D'autres échantillons envoyés n'ont pas pu être analysés en raison de l'aspect modifié du lait (lait baratté par exemple). Les moyennes obtenues sont donc à considérer avec prudence. Ensuite, la mesure de la CCS des échantillons réalisée à l'aide du compteur Delaval DCC® étant fait sur le site de l'expérimentation, après chaque point de mesure, le délai entre prélèvement et dosage était de fait considérablement réduit. Enfin, tous les échantillons de lait ont été analysés avec le compteur Delaval DCC®, sauf si une altération sévère de l'aspect du lait était constatée. D'autres modifications des CCS peuvent être dues à un éventuel défaut de conservation malgré les précautions prises en termes de stockage et de transport vers le CIAL SO.

Il aurait été intéressant de réaliser une comparaison plus exhaustive en incluant notamment les héli-mamelles non inoculées dans les dosages avec le compteur Delaval DCC®, mais seuls les prélèvements pour le CIAL SO ont été réalisés sur les deux héli-mamelles.

3.3. Résultats

3.3.1. Traduction clinique, biologique et lésionnelle de l'infection expérimentale

L'atteinte clinique et lésionnelle des hémi-mamelles inoculées sont clairement plus marquées que celle des hémi-mamelles témoins. Cela confirme l'imputabilité des mammites observées aux Staphylocoques inoculés et permet de considérer comme négligeable l'effet que pourraient avoir d'éventuels vestiges de mammites antérieures (CCS, bactéries, lésions).

Il est intéressant de noter que chaque pic de la concentration de *S. aureus* dans le lait (à 12 hpi et 80 hpi) est suivi d'une élévation marquée de la CCS (à 24 hpi et 88 hpi), différée de quelques heures dans le temps. Cela correspond au délai de réponse du système immunitaire des brebis après détection des bactéries dans la mamelle (Tizard 2009). Les signes cliniques sont observés plusieurs heures plus tard, avec une chute de la production laitière à J2 (i.e. à 32 hpi et 40 hpi), et une augmentation du score clinique mammaire 56h après inoculation.

Les formules leucocytaires observées mettent en évidence l'augmentation importante de la proportion de neutrophiles lors de la réaction inflammatoire déclenchée par l'IIM expérimentale à *S. aureus*, ce qui confirme l'implication des neutrophiles dans la réponse aux infections bactériennes (Winter et Colditz 2002; Paape et al. 2002). Les lésions de suppuration et d'abcédation du parenchyme sont également cohérentes avec la mobilisation des neutrophiles. Ils sont activés tôt dans la réponse immunitaire, comme en témoigne leur augmentation observée dès le premier point de contrôle après inoculation (12 hpi). Cela s'explique par leur recrutement non spécifique qui repose sur divers mécanismes de l'immunité innée (Tizard 2009; Oviedo-Boyso et al. 2007).

L'histologie des hémi-mamelles inoculées apporte également des éléments de réflexion quant à la nature de la réponse inflammatoire mammaire. En effet, les nœuds lymphatiques réactionnels, présentant un développement important des follicules lymphoïdes secondaires et une plasmocytose médullaire, retrouvés sur plusieurs hémi-mamelles témoignent d'une réponse humorale marquée. Chez la vache, plusieurs études rapportent l'implication d'une composante humorale dans la réponse aux IIM à *S. aureus*, en mettant en évidence une augmentation du taux de lymphocytes B (Riollet, Rainard, et Poutrel 2001) ou via le dosage d'anticorps (ou Ig) spécifiques lors une IIM par *S.aureus* (Queiroga 2018). L'intensité de cette réponse ainsi que son efficacité contre l'infection restent toutefois mal connues et nécessitent de plus amples recherches.

3.3.2. Différences phénotypiques entre les deux génotypes SOCS-2

Les différences observées entre les brebis des deux génotypes en termes d'atteinte clinique sont difficilement interprétables, les SCM des brebis porteuses de la mutation n'étant significativement supérieurs à ceux des brebis de génotype sauvage qu'à une seule date, soit 24h après l'inoculation.

D'un point de vue lésionnel, toutes les brebis porteuses du gène muté présentaient des abcès mammaires, contrairement aux brebis de génotype sauvage. Des résultats semblables avaient été mis en évidence dans une étude précédente dans les conditions d'élevage (Oget et al. 2018). Les scores histologiques calculés sont également plus élevés chez les individus porteurs de la mutation que chez les autres, malgré l'absence de signification statistique. Ceci pourrait traduire une évolution préférentielle des mammites vers la chronicité chez les brebis porteuses de la mutation. Les examens bactériologiques effectués sur le lait (culture conventionnelle et qPCR), notamment les plus tardifs, montrent des concentrations en bactéries non nulles, et similaires dans les deux groupes. Aucune différence entre brebis C/C et brebis T/T en ce qui concerne l'efficacité de la réaction immunitaire n'a été mise en évidence.

Étonnamment, les CCS des brebis de génotype sauvage sont similaires voire supérieures (de façon significative à 24 hpi) à celles des brebis porteuse de la mutation alors que cette dernière a été mise en évidence chez des brebis présentant des CCS élevées (Rupp et al. 2015). Une autre étude réalisée au domaine de La Fage a montré une différence significative des CCS des brebis porteuses de la mutation par rapport à celles porteuses de la forme sauvage du gène lors de l'étude des mammites subcliniques (Oget et al. 2018). Néanmoins, dans ces deux expérimentations, le caractère CCS a été évalué en raisonnant à l'échelle d'une lactation, et hors infection expérimentale, ce qui diffère du contexte et des modalités de mesures des CCS dans notre étude.

Le typage des leucocytes a montré une variation de la formule leucocytaire selon le génotype *Socs2* des brebis : les proportions de lymphocytes et de macrophages sont plus élevées chez les animaux de génotype sauvage que chez les autres, 24h après inoculation, ce qui suggère l'implication de la protéine SOCS-2 dans le recrutement des cellules leucocytaires lors de l'infection. Des études ont montré le rôle des protéines SOCS dans la régulation des voies de transduction intra-cellulaires (Kubo, Hanada, et Yoshimura 2003; Yoshimura et al. 2004; Yoshimura, Naka, et Kubo 2007), notamment sur la voie de signalisation JAK-STAT, que l'on sait impliquée dans la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Par leur action, les protéines SOCS modifieraient le signal intracellulaire émis et ainsi la

synthèse de cytokines qu'il engendre. Cela pourrait avoir un impact sur la nature et les quantités des cellules immunitaires recrutées sur le site de l'infection, et ce aux différents stades de la réponse immunitaire mammaire.

3.4. Perspectives

Plusieurs résultats de cette étude ne sont pas significatifs en raison d'une grande disparité inter-individuelle. Une alternative à nos méthodes d'analyse consisterait à étudier des couples de brebis ayant le même père. En effet, les béliers utilisés pour obtenir les agnelles (homozygotes *C/C* – i.e. génotype sauvage ou *T/T* – i.e. porteuse de la mutation) étaient hétérozygotes *C/T*. Certaines agnelles de génotypes différents avaient ainsi le même père. Les différences inter-individuelles existant entre deux demi-sœurs étant moindres que celles entre deux individus non apparentés, il serait intéressant d'étudier ces couples de demi-sœurs : les différences observées pourraient alors être liées de façon plus significative au génotype *Socs2* des brebis.

Les résultats de notre étude montre le rôle majeur que jouent les neutrophiles dans la réponse immunitaire à *S. aureus*. Néanmoins, certaines de nos analyses montrent également le recrutement et l'activité d'autres populations leucocytaires, comme les lymphocytes ou les monocytes et macrophages, qui semblent en outre être plus présentes chez les brebis de génotype sauvage que chez les brebis porteuses de la mutation. Une étude plus fine de ces sous-populations leucocytaires actives lors de la réponse mammaire est possible en utilisant des anticorps rendus fluorescents lors de l'analyse cellulaire en cytométrie de flux, et pourrait possiblement mettre en évidence des variations significatives de la réponse immunitaire aux mammites, selon le génotype des brebis en complétant les informations déjà collectées.

La mutation R96C a été mise en évidence en cartographiant un QTL détecté sur le chromosome autosomal 3 des brebis (Rupp et al. 2015). Selon les analyses menées pour la caractériser, elle était responsable de 12 % de la variance du caractère. D'autres recherches sont donc nécessaires pour caractériser l'effet d'autres SNP sur ce QTL. De même, d'autres QTL, dont certains d'ores et déjà mis en évidence (Banos et al. 2017; Oget et al. 2019). doivent être analysés afin de mettre en évidence leurs effets sur la résistance aux mammites.

Conclusion

Ce travail fait partie du projet REIDSOCS, plus large, destiné à caractériser le rôle de SOCS-2 dans l'immunité contre les infections bactériennes en analysant l'effet de l'inactivation de la protéine en lien avec la mutation ponctuelle R96C, tant sur l'immunité que sur les autres caractères laitiers. L'expérimentation visait à comparer les tableaux cliniques, fonctionnels, bactériologiques et cellulaires de deux groupes de brebis dont le génotype *Socs 2* diffère, suite à une IIM expérimentale à *S. aureus*.

Toutes les brebis ont déclaré une mammite clinique de l'hémi-mamelle inoculée, plus ou moins sévère, caractérisée par une diminution de la production laitière, une atteinte clinique incluant congestion, douleur, apparition d'abcès, etc. et modification de la sécrétion lactée. L'autopsie a révélé des lésions modérées à sévères de mammites nécrotico-fibrineuses à fibreuses, associées à une induration et/ou une abcédation du parenchyme mammaire. À l'échelle microscopique, des lésions subaiguës à chroniques telles qu'une suppuration des acini, une infiltration lympho-plasmocytaire, des abcès et de la fibrose ont été observées. Au cours de l'expérimentation, les CCS augmentaient de façon significative dans les heures suivant l'inoculation. La sous-population leucocytaire majoritaire est celle des neutrophiles, suggérant la part importante de l'immunité innée dans la réponse aux IIM à *S. aureus*. L'analyse histopathologique des nœuds lymphatiques suggère également l'existence d'une composante humorale dans la réponse immunitaire aux mammites à *S. aureus*.

Les brebis porteuses de la forme sauvage du gène n'étaient pas significativement moins atteintes que les brebis porteuses de la mutation d'un point de vue clinique ou biologique. Les CCS étaient similaires dans les deux groupes, mais la proportion de lymphocytes et de macrophages/monocytes était supérieure chez les brebis de génotype sauvage à 24 hpi, suggérant l'implication de SOCS-2 dans le recrutement de certaines lignées leucocytaires actives lors de la réaction immunitaire. Les neutrophiles demeurent néanmoins une population majoritaire. D'un point de vue lésionnel, il semble que les brebis porteuses de la mutation présentent plus de lésions évoluant vers la chronicité que les brebis de génotype sauvage.

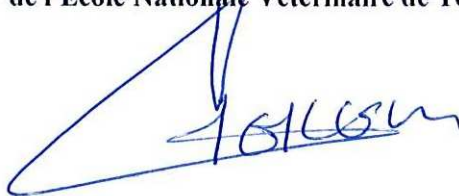
Cet essai n'a pas permis la mise en évidence un effet majeur de SOCS-2 dans la résistance à l'infection mammaire par *S. aureus*, bien que plusieurs observations comme la formule leucocytaire ou la nature des lésions indiquent des différences de la réponse entre les deux génotypes. Des contraintes liées à l'expérimentation, en particulier des effectifs restreints alors qu'il existe un certain degré de variabilité génétique, ou la méthode d'épreuve intra-mammaire peuvent participer à ces résultats peu contrastés. L'implication de sources de variabilité de la réponse immunitaire autres que SOCS-2 dans la résistance aux mammites est très probable et mérite que ce type d'étude soit maintenu et élargi à d'autres cibles.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

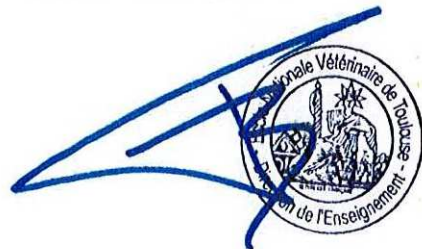

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, Gilles FOUCRAS, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de Laurence FRAYSSIGNES intitulée « Réponse inflammatoire mammaire et effet d'une mutation de SOCS-2 lors de mammite à *Staphylococcus aureus* chez la brebis Lacaune » 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 Régine André-Obrach
Par délégation
Richard Guilet

Mme Laurence FRAYSSIGNES
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.

Sources bibliographiques

- Albenzio, M., A. Santillo, M. Caroprese, D. Ruggieri, M. Ciliberti, et A. Sevi. 2012. « Immune Competence of the Mammary Gland as Affected by Somatic Cell and Pathogenic Bacteria in Ewes with Subclinical Mastitis ». *Journal of Dairy Science* 95 (7): 3877-87. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5357>.
- Albenzio, M., L Taibi, A Muscio, et A. Sevi. 2002. « Prevalence and etiology of subclinical mastitis in intensively managed flocks and related changes in the yield and quality of ewe milk ». *Small Ruminant Research* 43: 219-26.
- Amorena, B, R Baselga, et I Albizu. 1994. « Use of liposome-immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine ». *Vaccine* 12 (3): 243-49.
- Arsenault, Julie, Pascal Dubreuil, Robert Higgins, et Denise Bélanger. 2008. « Risk Factors and Impacts of Clinical and Subclinical Mastitis in Commercial Meat-Producing Sheep Flocks in Quebec, Canada ». *Preventive Veterinary Medicine* 87 (3-4): 373-93. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.05.006>.
- Astruc, JM. 2017. « Bilan de 10 ans de sélection sur la résistance aux mammites en ovins laitiers ». http://idele.fr/fileadmin/medias/Documents/Docs_UMT_SPR/MAMOVICAP_fevrier2017_Bilan_de_10ans_de_selection_sur_la_resistance_aux_mammities_en_ovins_laitiers_JM._Astruc.pdf.
- Astruc, JM, G Baloché, D Buisson, J Labatut, G Lagriffoul, H Larroque, C Robert-Granié, A Legarra, et F Barrillet. 2016. « La sélection génomique des ovins laitiers en France ». *INRA Production Animales*, n° 1: 41-56.
- Astruc, JM, et D Buisson. 2018. « Les nouveaux caractères ». <http://idele.fr/domaines-techniques/ameliorer-le-troupeau/evaluation-genetique/publication/idelesolr/recommends/selection-genomique-ovin-lait-copie-9.html>.
- Astruc, JM, et D Buisson. 2019. « Les Schémas de Sélection Génomiques ». Idele.Fr. 17 janvier 2019. http://idele.fr/no_cache/recherche/publication/idelesolr/recommends/les-schemas-de-selection-genomiques.html.
- Aughey, E, et FL Frye. 2001. *Comparative Veterinary Histology*. Manson Publishing.
- Banos, G., G. Bramis, S. J. Bush, E. L. Clark, M. E.B. McCulloch, J. Smith, G. Schulze, G. Arsenos, D. A. Hume, et A. Psifidi. 2017. « The Genomic Architecture of Mastitis Resistance in Dairy Sheep ». *BMC Genomics* 18 (1). <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3982-1>.
- Barillet, F, A Carta, D Allain, Y Amigues, L Bodin, S Casu, EP Cribru, et al. 2003. « Détection de QTL influençant des caractères d'importance économique présente ou à venir en ovins laitiers en France et en Italie » 10.

- Barillet, Francis, Rachel Rupp, Sandrine Mignon-Grasteau, Jean-Michel Astruc, et Michèle JACQUIN. 2001. « Genetic analysis for mastitis resistance and milk somatic cell score in French Lacaune dairy sheep ». *Genetics Selection Evolution* 33 (4): 397-415. <https://doi.org/10.1051/gse:2001124>.
- Barillet, G Lagriffoul, R Rupp, D Portes, et F Bocquier. 2016. « Objectifs de sélection et stratégie raisonnée de mise en œuvre à l'échelle des populations de brebis laitières françaises », 22.
- Bergonier, D, et X Berthelot. 2003. « New Advances in Epizootiology and Control of Ewe Mastitis ». *Livestock Production Science* 79 (1): 1-16. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00145-8](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00145-8).
- Bergonier, D, M C Blanc, B Fleury, G Lagriffoul, F Barillet, et X Berthelot. 1997. « Les mammites des ovins et des caprins laitiers : Etiologie, Epidemiologie, controle », 10.
- Bergonier, D, R de Cremoux, R Rupp, G Lagriffoul, et X Berthelot. 2003. « Mastitis of Dairy Small Ruminants ». *Veterinary Research* 34 (5): 689-716. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003030>.
- Bergonier, D., et F. Poumarat. 1996. « Agalactie contagieuse des petits ruminants: épidémiologie, diagnostic et contrôle »: *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* 15 (4): 1431-75. <https://doi.org/10.20506/rst.15.4.988>.
- Berthelot, X, G Lagriffoul, D Concordet, F Barillet, et D Bergonier. 2006. « Physiological and Pathological Thresholds of Somatic Cell Counts in Ewe Milk ». *Small Ruminant Research* 62: 27-31.
- Bjorland, J, T Steinum, K Bjorg, W Steinar, M Sunde, et E Heir. 2005. « Widespread Distribution of Disinfectant Resistance Genes among Staphylococci of Bovine and Caprine Origin in Norway ». *Journal of Clinical Microbiologie* 43 (9): 4363-68.
- Bourély, Clémence, Géraldine Cazeau, Nathalie Jarrige, Didier Calavas, Jean-Luc Vinard, Jean-Yves Madec, Agnès Leblond, Marisa Haenni, et Émilie Gay. 2019. « APPORT DU RESAPATH POUR LA CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES RESISTANCES DES BACTERIES RESPONSABLES DE MAMMITES CHEZ LES VACHES LAITIERES EN FRANCE », mars, 12.
- Caja, Gerardo, Xavier Such, et Maristela Rovai. 2004. « Udder Morphology and Machine Milking Ability in Dairy Sheep ». *Great Lakes Dairy Sheep Symposium*, 24.
- Contreras, A, D Sierra, A Sanchez, JC Corrales, JC Marco, MJ Paape, et C Gonzalo. 2007. « Mastitis in small ruminants ». *Small Ruminant Research* 68: 145-53.

- Crocker, Ben A., Hiu Kiu, et Sandra E. Nicholson. 2008. « SOCS Regulation of the JAK/STAT Signalling Pathway ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19 (4): 414-22. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.07.010>.
- Cuccuru, C, P Moroni, A Zecconi, S Casu, A Caria, et A Contini. 1997. « Milk Differential Cell Counts in Relation to Total Counts in Sardinian Ewes ». *Small Ruminant Research* 25: 169-73.
- Cuppen, E. 2007. « Genotyping by Allèle-Specific Amplification (KASPar) ». *Cold Spring Harbor Protocols*, septembre. <https://doi.org/doi:10.1101/pdb.prot4841>.
- Delacroix-Buchet, A, F Barillet, et G Lagriffoul. 1994. « Caractérisation de l'aptitude fromagère des laits de brebis Lacaune à l'aide d'un Formagraph ». *Lait* 74: 14.
- Detilleux, JC. 2002. « Genetic factors affecting susceptibility of dairy cows to udder pathogens ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 88: 103-10.
- Deverrière, BVM. 2007. « Reproduction expérimentale de mammites à *Staphylococcus aureus* chez le brebis : comparaison de lignées génétiques divergentes pour les comptages cellulaires ». Toulouse: Paul Sabatier.
- DGAL. 2017. « Ecoantibio - Réduire l'utilisation des antibiotiques vétérinaires ». <https://agriculture.gouv.fr/le-plan-ecoantibio-2-2017-2021>.
- Eurell, et Frappier. 2006. *Textbook of Veterinary Histology, 6th Edition*. Blackwelle Publishing.
- Fails, AD, et C Magee. 2018. « Anatomy and Physiology of the Mammary Glands ». In *Anatomy and Physiology of Farm Animals - 8th Edition*, 501-15. Wiley Blackwell.
- Fragkou, I.A., C.M. Boscov, et G.C. Fthenakis. 2014. « Diagnosis of Clinical or Subclinical Mastitis in Ewes ». *Small Ruminant Research* 118 (1-3): 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.12.015>.
- Fragkou, I.A., D.A. Gougoulis, C. Billinis, V.S. Mavrogianni, M.J. Bushnell, P.J. Cripps, A. Tzora, et G.C. Fthenakis. 2011. « Transmission of *Mannheimia Haemolytica* from the Tonsils of Lambs to the Teat of Ewes during Sucking ». *Veterinary Microbiology* 148 (1): 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.008>.
- France Génétique Elevage. 2010. « Les races Lacaune ». 2010. http://fr.france-genetique-elevage.org/IMG/pdf/plaquette_races_lacaune-2.pdf.
- Fthenakis, G.C., et J.E.T. Jones. 1990. « The Effect of Experimentally Induced Subclinical Mastitis on Milk Yield of Ewes and on the Growth of Lambs ». *British Veterinary Journal* 146 (1): 43-49. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(90\)90075-E](https://doi.org/10.1016/0007-1935(90)90075-E).

- Giadinis, N.D., G. Arsenos, P. Tsakos, V. Psychas, C.I. Dovas, E. Papadopoulos, H. Karatzias, et G.C. Fthenakis. 2012. « “Milk-Drop Syndrome of Ewes”: Investigation of the Causes in Dairy Sheep in Greece ». *Small Ruminant Research* 106 (1): 33-35. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.04.018>.
- Gogoi-Tiwari, Jully, Vincent Williams, Charlene Babra Waryah, Karina Yui Eto, Modiri Tau, Paul Costantino, Harish Kumar Tiwari, et Trilochan Mukkur. 2015. « Comparative Studies of the Immunogenicity and Protective Potential of Biofilm vs Planktonic *Staphylococcus Aureus* Vaccine against Bovine Mastitis Using Non-Invasive Mouse Mastitis as a Model System ». *Biofouling* 31 (7): 543-54. <https://doi.org/10.1080/08927014.2015.1074681>.
- Gonzalez-Rodriguez, MC, et P Carmenes. 1996. « Evaluation of the Californian mastitis test as a discriminant methode to detect suclinical mastitis in ewes ». *Small Ruminant Research* 21: 245-50.
- Gonzalo, C, A Ariznabarreta, J.A. Carriedo, et F San Primitivo. 2002. « Mammary Pathogens and Their Relationship to Somatic Cell Count and Milk Yield Losses in Dairy Ewes ». *Journal of Dairy Science* 85: 1460-67.
- Gonzalo, C., J.A. Carriedo, M.A. Blanco, E. Beneitez, M.T. Juárez, L.F. De La Fuente, et F. San Primitivo. 2005. « Factors of Variation Influencing Bulk Tank Somatic Cell Count in Dairy Sheep ». *Journal of Dairy Science* 88 (3): 969-74. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72764-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72764-8).
- Gonzalo, C, et VR Gaudioso. 1985. « Evolution des types cellulaires du lait de brebis (race Churra) en fonction des dénombrements cellulaires totaux pendant la traite mécanique manuelle ». *Annales de Zootechnie* 34 (3): 257-64.
- Gonzalo, C, B Linage, J.A. Carriedo, F De La Fuente, et F San Primitivo. 2006. « Evaluation of the Overall Accuracy of the Delaval Cell Counter for Somatic Cell Counts inOvine Milk ». *Journal of Dairy Science* 89: 4613-19.
- Gonzalo, C, JR Martinez, J.A. Carriedo, et F San Primitivo. 2003. « Fossomatic Cell-Counting on Ewe Milk : Comparison with Direct Microscopy and Study of Variation Factors ». *Journal of Dairy Science* 86: 138-45.
- Gonzalo, J Alfonso Tardáguila, L Fernando De La Fuente, et Fermín San Primitivo. 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* 71 (1): 33-38. <https://doi.org/10.1017/S0022029903006526>.
- Greenhalgh, Christopher J, Elizabeth Rico-Bautista, Mattias Lorentzon, Anne L Thaus, Phillip O Morgan, Tracy A Willson, Panagiota Zervoudakis, et al. 2005. « SOCS2 Negatively

- Regulates Growth Hormone Action in Vitro and in Vivo ». *The Journal of Clinical Investigation* 115 (2): 11. <https://doi.org/10.1172/JCI22710>.
- Heringstad, B, G Klemetsdal, et J Ruane. 2000. « Selection for mastitis resistance in dairy cattle : a review with focus on the situation in the Nordic countries ». *Livestock Production Science* 64: 95-106.
- IDELE, CNE. 2018. « Les chiffres clés du GEB - Ovins 2018, production lait et viande ». <http://idele.fr/domaines-techniques/publication/idelesolr/recommends/chiffres-cles-ovins-2018.html>.
- INRA, et IDELE. 2011. *La révolution génomique animale*. France Agricole. Agri production.
- Klinglmaier, K, P Winter, et W Baumgartner. 2005. « Studies on the uses of Blu-Gard Spray® in dairy sheep ». *Small Ruminant Research* 58: 157-62.
- Kubo, Masato, Toshikatsu Hanada, et Akihiko Yoshimura. 2003. « Suppressors of Cytokine Signaling and Immunity ». *Nature Immunology* 4 (12): 1169-76. <https://doi.org/10.1038/ni1012>.
- Labussière, J., D. Dotchewski, et J.F. Combaud. 1981. « Caractéristiques morphologiques de la mamelle des brebis Lacaune. Méthodologie pour l'obtention des données Relations avec l'aptitude à la traite ». *Annales de zootechnie* 30 (2): 115-36.
- Leitner, G., M Chaffer, S Zamir, T Mor, A Glickman, M Winkler, et A Saran. 2001. « Udder Disease Etiology, Milk Somatic Cell Counts and NAGase Activity in Israeli Assaf Sheep throughout Lactation ». *Small Ruminant Research* 39: 107-12.
- Leitner, G., S Sapeiro, O Krifucks, L Weisblit, Y Lavi, et ED Heller. 2011. « Systemic and local mammary gland immunity to udder infection in goats by various Staphylococcus species ». *Small Ruminant Research* 95: 160-67.
- Linossi, Edmond M., Jeffrey J. Babon, Douglas J. Hilton, et Sandra E. Nicholson. 2013. « Suppression of Cytokine Signaling: The SOCS Perspective ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 24 (3): 241-48. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.03.005>.
- Little, CL, JR Rhoades, SK Sagoo, J Harris, M Greenwood, V Mithani, K Grant, et J McLauchlin. 2008. « Microbiological Quality of Retail Cheeses Made from Raw, Thermized or Pasteurized Milk in the UK », avril.
- Lowy, Franklin D. 1998. « Staphylococcus aureus infections ». *The New England Journal of Medicine* 339: 520-32.
- McBerry, Cortez, Rosa Maria Salazar Gonzalez, Nathaniel Shryock, Alexandra Dias, et Julio Aliberti. 2012. « SOCS2-Induced Proteasome-Dependent TRAF6 Degradation: A

- Common Anti-Inflammatory Pathway for Control of Innate Immune Responses ». Édité par Guillermo H. Giambartolomei. *PLoS ONE* 7 (6): e38384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038384>.
- Menzies, Paula I, et Siti Z Ramanoon. 2001. « Mastitis of Sheep and Goats » 17 (2): 333-58.
- Mørk, Tormod, Steinar Waage, Tore Tollersrud, Bjørg Kvitle, et Ståle Sviland. 2007. « Clinical Mastitis in Ewes; Bacteriology, Epidemiology and Clinical Features ». *Acta Veterinaria Scandinavica* 49 (1). <https://doi.org/10.1186/1751-0147-49-23>.
- Nickerson, SC, et RM Akers. 2011. « Mammary Gland Anatomy ». In *Encyclopedia of Dairy Sciences, Seconde Edition*, 3:328-37.
- Oget, Allain, Portes, Foucras, Alessandra Stella, Astruc, Sarry, Tosser-Klopp, et Rupp. 2019. « A Validation Study of Loci Associated with Mastitis Resistance in Two French Dairy Sheep Breeds ». *Genetics Selection Evolution* 51 (1). <https://doi.org/10.1186/s12711-019-0448-8>.
- Oget, Allain, Portes, Foucras, Tosser-Klopp, et Rupp. 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 ». *Proceedings of the World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, février, 8.
- Omaleki, Lida, Glenn F. Browning, Joanne L. Allen, et Stuart R. Barber. 2011. « The Role of Mannheimia Species in Ovine Mastitis ». *Veterinary Microbiology* 153 (1-2): 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.024>.
- Oviedo-Boyso, Javier, Juan J Valdez-Alarcon, Marcos Cajero-Juarez, Alejandra Ochoa-Zarzoza, Joel E Lopez-Meza, Alejandro Bravo-Patino, et Victor M Baizabal-Aguirre. 2007. « Innate Immune Response of Bovine Mammary Gland to Pathogenic Bacteria Responsible for Mastitis ». *Journal of Infection*, n° 54: 399-409. <https://doi.org/doi:10.1016/j.jinf.2006.06.010>.
- Paape, M.J., Bernard Poutrel, Antonio Contreras, Juan C. Marco, et A.V. Capuco. 2001. « Milk Somatic Cells and Lactation in Small Ruminants ». *Journal of Dairy Science* 84 (juin): E237-44. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70223-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70223-8).
- Paape, M.J., et H.A. Tucker. 1966. « Somatic Cell Content Variation in Fraction-Collected Milk ». *Journal of Dairy Science* 49 (3): 265-67. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(66\)87847-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(66)87847-5).
- Paape, M.J., GR Wiggans, DD Bannerman, DL Thomas, AH Sanders, A Contreras, P Moroni, et RH Miller. 2007. « Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts ». *Small Ruminant Research* 68: 114-25.

- Paape, M.J., X Zhao, J Mehrzad, et J Detilleux. 2002. « Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes ». *Journal of MAMmary Gland Biology and Neoplasia* 7 (2).
- Peris, C, P Molina, N Fernandez, M Rodriguez, et A Torres. 1991. « Variation in Somatic Cell Count, California Mastitis Test, and Electrical Conductivity Among Various Fractions of Ewe's Milk ». *Journal of Dairy Science* 74 (5). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78317-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78317-3).
- Queiroga, Maria Cristina. 2018. « Local and Systemic Humoral Response to Ovine Mastitis Caused by *Staphylococcus Epidermidis* ». *SAGE Open Medicine* 6 (janvier): 205031211880146. <https://doi.org/10.1177/2050312118801466>.
- Rainard, Pascal, et Céline Riollet. 2003. « Mobilization of Neutrophils and Defense of the Bovine Mammary Gland ». *Reproduction Nutrition Development* 43 (5): 439-57. <https://doi.org/10.1051/rnd:2003031>.
- Règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. s. d. Consulté le 28 mai 2019. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20100519&rid=5>.
- Résapath. 2019. « RESAPATH - Annual Report 2017 ». ANSES. https://resapath.anses.fr/resapath_uploadfiles/files/Documents/2017_RESAPATH%20annual%20report.pdf.
- « Résumé des Caractéristiques du Produit : VIMCO EMULSION INJECTABLE POUR BREBIS ET CHEVRES ». 2019. 30 avril 2019. <http://www.ircp.anmv.anses.fr/rcp.aspx?NomMedicament=VIMCO+EMULSION+INJECTABLE+POUR+BREBIS+ET+CHEVRES>.
- Riollet, C, P Rainard, et Bernard Poutrel. 2001. « Cell Subpopulations and Cytokine Expression in Cow Milk in Response to Chronic *Staphylococcus Aureus* Infection | Elsevier Enhanced Reader ». *Journal of Dairy Science*, n° 84: 1077-84. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74568-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74568-7).
- Robert-Granié, C, A Legarra, et V Ducrocq. 2011. « Principes de base de la sélection génomique ». *INRA Production Animales*, n° 24: 331-40.
- Rosengren, Asa, Ane Fabricius, Bengt Guss, Susanne Sylven, et Roland Lindqvist. 2010. « Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies ». *International Journal of Food Microbiology*, n° 144 (octobre): 263-69.

- Rovai, M., G. Caja, A.A.K. Salama, A. Jubert, B. Lázaro, M. Lázaro, et G. Leitner. 2014. « Identifying the Major Bacteria Causing Intramammary Infections in Individual Milk Samples of Sheep and Goats Using Traditional Bacteria Culturing and Real-Time Polymerase Chain Reaction ». *Journal of Dairy Science* 97 (9): 5393-5400. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7988>.
- Rovai, M., DL Thomas, YM Berger, et G. Caja. 2004. « Udder Morphology and Effects on Milk Production and Ease of Milking in Dairy Sheep ».
- Rupp, et Boichard. 2003. « Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle ». *Veterinary Research* 34 (5): 671-88. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003020>.
- Rupp, R, I Palhière, C Maroteau, C Balloche, G Sallé, A Tircazes, C Moreno, C Foucras, et G Tosser-Klopp. 2014. « Mapping QTL Controlling Milk Somatic Cell Counts in Sheep and Goat Support the Polygenic Architecture of Mastitis Resistance ». *Proceedings, 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production*.
- Rupp, Pavel Senin, Julien Sarry, Charlotte Allain, Christian Tasca, Laetitia Ligat, David Portes, et al. 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 ». Édité par James Kijas. *PLOS Genetics* 11 (12): e1005629. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005629>.
- Saratsis, P, L Leontides, A Tzora, C Alexopoulos, et G.C Fthenakis. 1998. « Incidence Risk and Aetiology of Mammary Abnormalities in Dry Ewes in 10 Flocks in Southern Greece ». *Preventive Veterinary Medicine* 37 (1-4): 173-83. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(98\)00111-1](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(98)00111-1).
- Simon. 1999. « Role and regulation of cyclooxygenase -2 during inflammation ». *The American Journal of Medecine* 106 (mai): 37S-42S.
- Souza, F.N., M.G. Blagitz, C.F.A.M. Penna, A.M.M.P. Della Libera, M.B. Heinemann, et M.M.O.P. Cerqueira. 2012. « Somatic Cell Count in Small Ruminants: Friend or Foe? ». *Small Ruminant Research* 107 (2-3): 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.04.005>.
- Taponen, S, L Salmikivi, H Simojoki, MT Koskinen, et S Pyorala. 2009. « Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing ». *Journal of Dairy Science* 92 (6): 2610-17.
- Thomas, G, JM Astruc, et X Bourrigan. 2018. « Résultats de Contrôle Laitier - Espèce Ovine France 2018 (IDELE) ».

Tizard, Ian R. 2009. *Veterinary Immunology - An Introduction, 8th Edition*. Saunders elsevier.

Tollersrud, T, P E Nörstebö, J P Engvik, S R Andersen, L J Reitan, et A Lund. 2002. « Antibody Responses in Sheep Vaccinated against Staphylococcus Aureus Mastitis: A Comparison of Two Experimental Vaccines Containing Different Adjuvants ». *Veterinary Research Communications*, n° 26: 587-600.

Vesterlund, Mattias, Fahad Zadjali, Torbjörn Persson, Michael Lund Nielsen, Benedikt M. Kessler, Gunnar Norstedt, et Amilcar Flores-Morales. 2011. « The SOCS2 Ubiquitin Ligase Complex Regulates Growth Hormone Receptor Levels ». Édité par Irina Agoulnik. *PLoS ONE* 6 (9): e25358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025358>.

Watkins, G. H., A. R. Burriel, et J. E. Jones. 1991. « A Field Investigation of Subclinical Mastitis in Sheep in Southern England ». *The British Veterinary Journal* 147 (5): 413-20. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(91\)90083-Y](https://doi.org/10.1016/0007-1935(91)90083-Y).

Williams, T. J., et J. Morley. 1973. « Prostaglandins as Potentiators of Increased Vascular Permeability in Inflammation ». *Nature* 246 (5430): 215-17. <https://doi.org/10.1038/246215a0>.

Winter, P, et I.G Colditz. 2002. « Immunological Responses of the Lactating Ovine Udder Following Experimental Challenge with Staphylococcus Epidermidis ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 89 (1-2): 57-65. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00184-8](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00184-8).

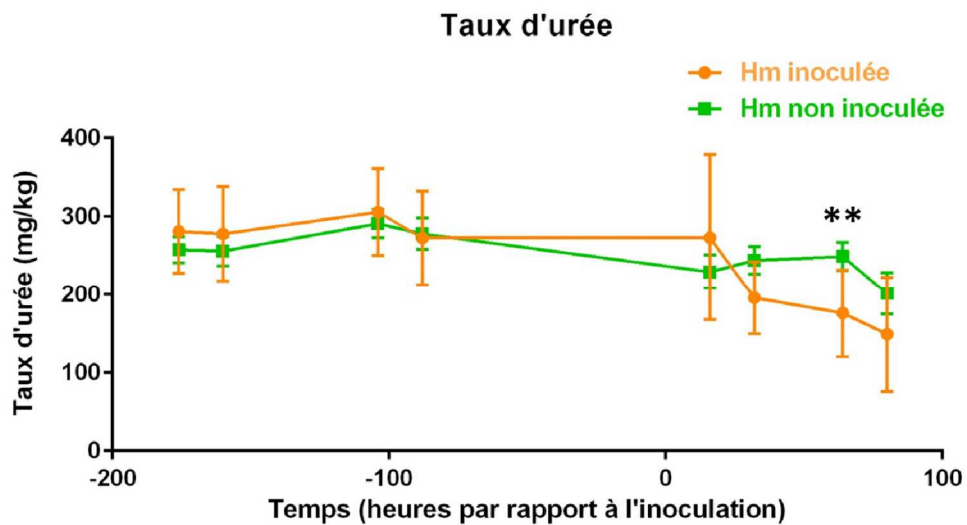
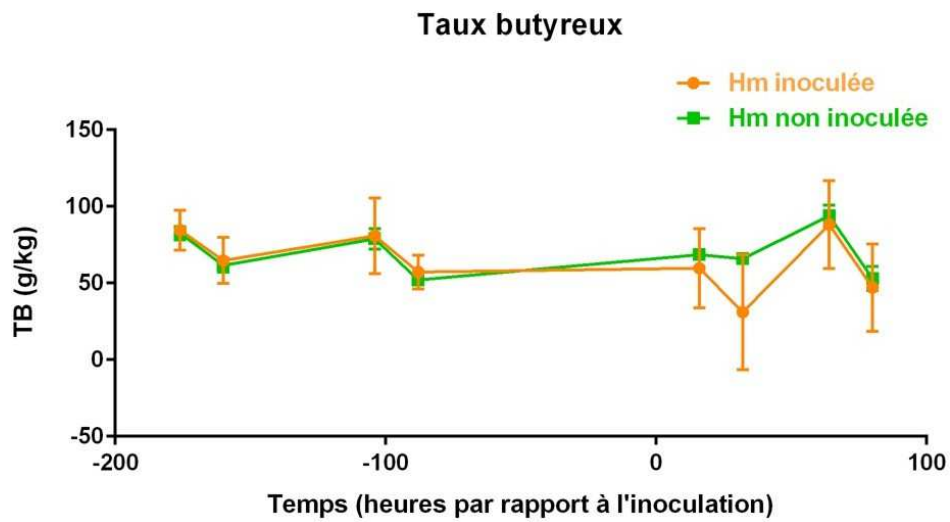
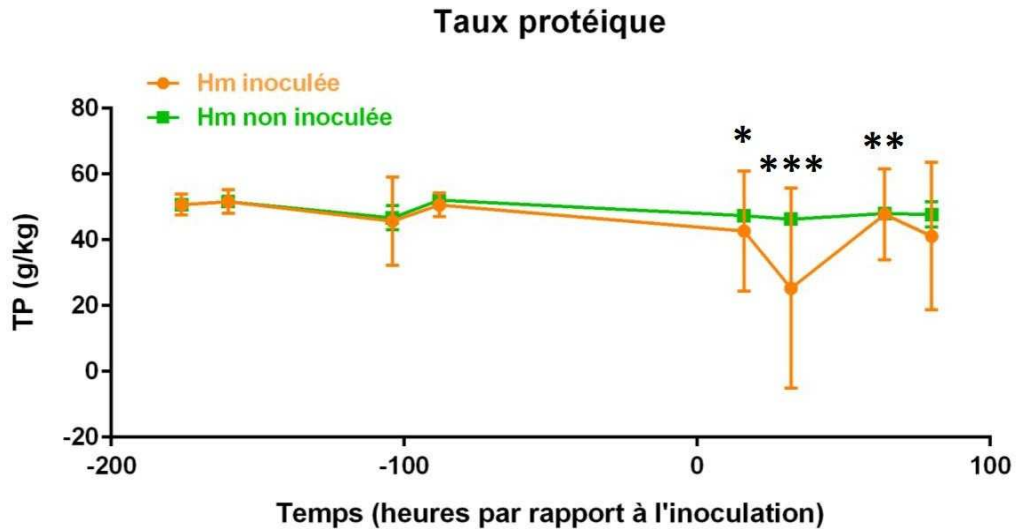
Yoshimura, Akihiko, Tetsuji Naka, et Masato Kubo. 2007. « SOCS Proteins, Cytokine Signalling and Immune Regulation ». *Nature Reviews Immunology* 7 (6): 454-65. <https://doi.org/10.1038/nri2093>.

Yoshimura, Akihiko, Hiroyuki Mori Masanobu Ohishi, Daisuke Aki, et Toshikatsu Hanada. 2004. « Regulation of TLR Signaling and Inflammation by SOCS Family Proteins ». *Journal of Leukocyte Biology* 75 (3): 422-27. <https://doi.org/10.1189/jlb.0403194>.

Annexes

2. Évolution des taux du lait au cours de l'expérimentation

Analyse statistique : Mann-Whitney



3. Lésions macroscopiques observées lors de l'autopsie

C/C : brebis porteuse du gène sauvage

T/T : brebis porteuse du gène muté

Brebis	Génotype	Volume / consistance augmenté		Congestion / nécrose		Fibrine		Abcès	
		Hm I	Hm NI	Hm I	Hm NI	Hm I	Hm NI	Hm I	Hm NI
054	C/C	+	-	-	-	+	-	+	-
140	T/T	-	-	-	-	-	-	+	-
142	C/C	-	-	-	-	+	-	+	-
145	C/C	+	-	-	-	+	-	-	-
237	T/T	+	+	-	-	+	-	+	-
268	T/T	+	-	-	-	+	-	+	-
272	C/C	+	-	-	-	+	-	-	-
289	C/C	-	-	-	-	+	-	+	-
306	C/C	+	-	-	-	-	-	-	-
397	T/T	+	+	+	-	+	-	+	-
402	T/T	+	-	-	-	-	-	+	-
430	T/T	+	-	+	-	+	-	+	-
446	T/T	+	-	+	-	+	-	+	-
472	C/C	+	-	-	-	+	-	-	-
Total		11/14	2/14	3/14	0/14	11/14	0/14	10/14	0/14
Dont C/C		5/7	0/7	0/7	0/7	6/7	0/7	7/7	0/7
Dont T/T		6/7	2/7	3/7	0/7	5/7	0/7	3/7	0/7

4. Lésions microscopiques observées lors de l'examen histopathologique

C/C : brebis porteuse du gène sauvage

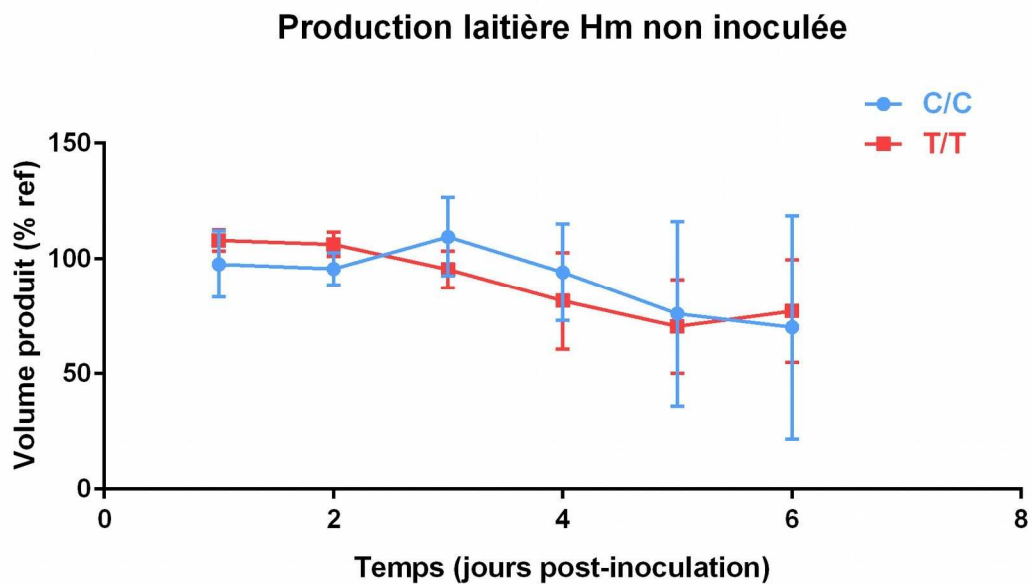
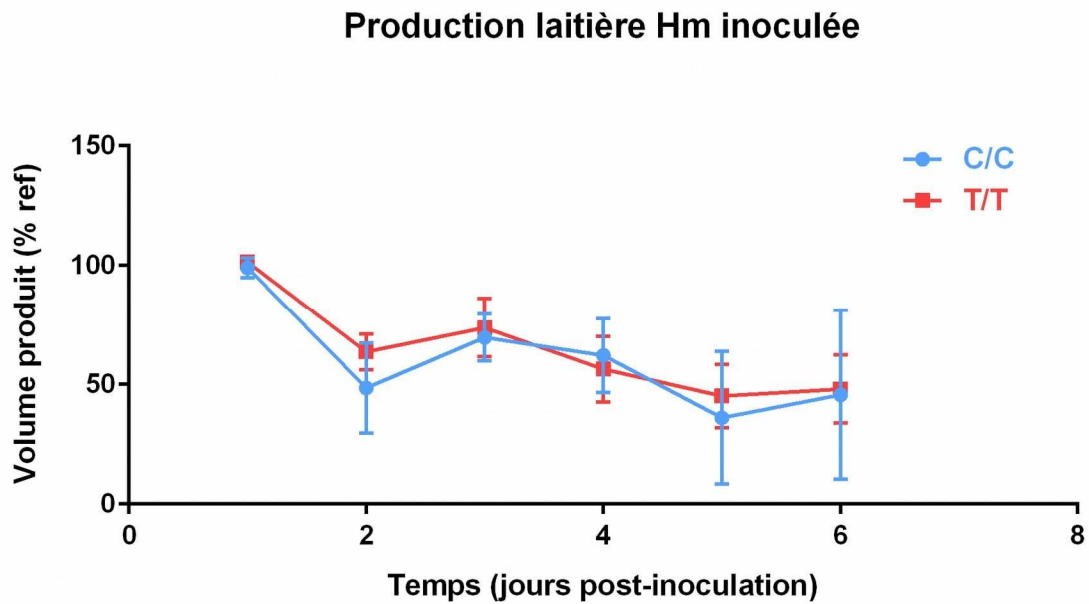
T/T : brebis porteuse du gène muté

Brebis	Génotype	Suppuration		Infiltration lymphocytaire		Absès		Fibrose		NL réactionnel	
		Hm I	Hm NI	Hm I	Hm NI	Hm I	Hm NI	Hm I	Hm NI	Hm I	Hm NI
054	C/C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
140	T/T	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	+
142	C/C	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
145	C/C	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
237	T/T	+	NA	+	NA	+	NA	+	NA	+	+
268	T/T	+	NA	+	NA	+	NA	+	NA	+	+
272	C/C	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
289	C/C	+	NA	+	NA	-	NA	+	NA	+	-
306	C/C	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
397	T/T	+	NA	+	NA	+	NA	+	NA	+	+
402	T/T	+	NA	+	NA	+	NA	+	NA	+	-
430	T/T	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
446	T/T	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
472	C/C	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Total		8/12	2/7	11/12	2/7	7/12	0/7	8/12	0/7	12/13	6/13
Dont C/C		4/6	2/5	5/6	2/5	2/6	0/5	3/6	0/5	6/6	2/6
Dont T/T		4/6	0/2	6/6	0/2	5/6	0/2	5/6	0/2	6/7	4/7

5. Évolution de la production laitière relative par hémimamelle et par groupe

C/C : brebis porteuse du gène sauvage

T/T : brebis porteuse du gène muté

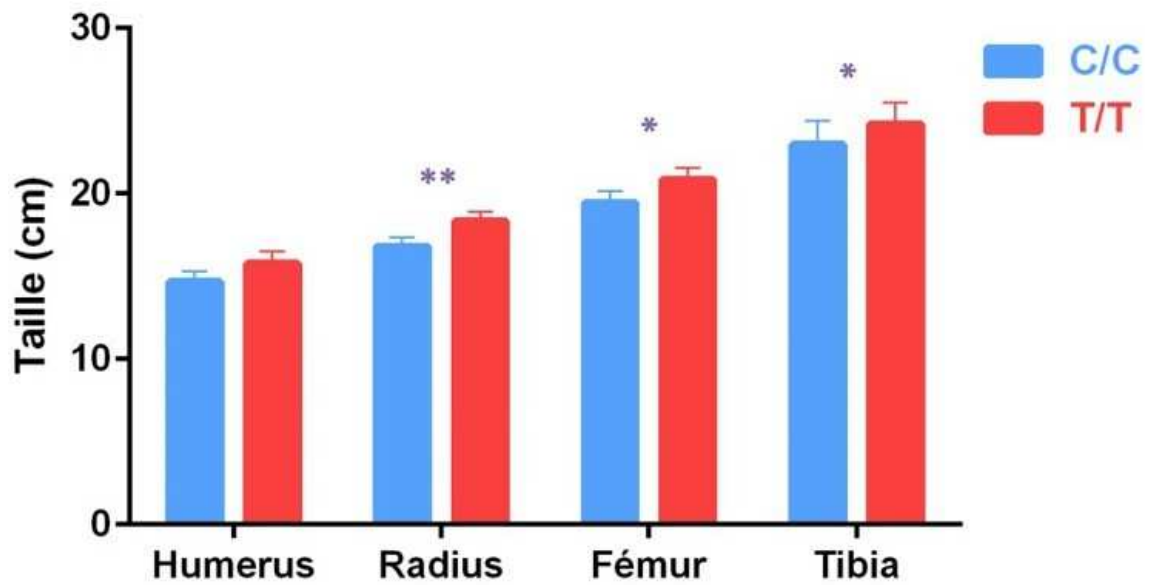


6. Évaluation de l'impact de SOCS2 sur la croissance – taille des os longs

C/C : brebis porteuse du gène sauvage

T/T : brebis porteuse du gène muté

Analyse statistique : ANOVA à 2 niveaux



Titre : Réponse inflammatoire mammaire et effet d'une mutation ponctuelle de SOCS-2 lors de mammite à *Staphylococcus aureus* chez la brebis Lacaune

Résumé :

L'utilisation de la sélection génétique chez les ovins laitiers en France conduit à s'intéresser au support génétique de la résistance aux mammites. Le but de cette étude est de caractériser la réaction inflammatoire à une infection intra-mammaire expérimentale à *Staphylococcus aureus* et d'analyser l'impact d'une mutation ponctuelle de SOCS-2 sur la réponse mammaire chez la brebis. Nous avons d'abord caractérisé l'infection par comparaison des deux hémi-mamelles inoculée et témoin. Les caractères clinique, lésionnel et biologique de l'hémi-mamelle inoculée sont différents après inoculation. En revanche, peu de différences ont été observées entre les deux groupes génétiques, malgré un recrutement moindre des leucocytes mononucléés ou le développement d'abcès plus fréquent chez les brebis porteuses de la mutation.

Mots-clés : mammite, brebis, SOCS-2, *Staphylococcus*, immunité,

Title : Inflammatory response and effect of a point-mutation of SOCS-2 in case of *Staphylococcus aureus* mastitis in Lacaune ewes.

Summary:

Implementation of genomic selection in dairy sheep leads to investigate the genetic support of mastitis resistance. The aim of this study is to characterize the mammary response to an intra-mammary infection with *Staphylococcus aureus* and to analyse the impact of a point mutation of SOCS-2 on the mammary response in ewes. We first characterised the infection comparing inoculated and control half-udders. Inoculated glands were clearly more affected in regard with the results of clinical, biological, and necropsic examinations. However, few significant differences were found between ewes of the two *Socs2* genotypes. Nevertheless, milder recruitment of mononuclear cells and frequent development of abscesses were seen in ewes carrying the point mutation.

Key-words : mastitis, ewes, SOCS-2, *Staphylococcus*, immunity