



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

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

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 4035](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID%3A4035)

To cite this version :

DE MARCHI, Loïc. *Impact de l'excès chronique d'azote soluble dans la ration des bovins sur la diapédèse et la phagocytose des neutrophiles sanguins*. Thèse d'exercice, Médecine Vétérinaire, Toulouse 3, 2010, 137 p.

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

Impact de l'excès chronique d'azote soluble dans la ration des bovins sur la diapédèse et la phagocytose des neutrophiles sanguins

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2010
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Loïc, Clément DE MARCHI
Né le 16.01.1984 à Villeneuve sur Lot (47)

Directeur de thèse : M. le Professeur Gilles Foucras

JURY

PRESIDENT :
M. Antoine BLANCHER

Professeur à l'université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. Gilles FOUCRAS
M. François SCHELCHER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :
M. Didier RABOISSON

Assistant d'Enseignement et de Recherche à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

REMERCIEMENTS

A notre jury de thèse,

Monsieur le Professeur Antoine Blancher,

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

Hommages respectueux.

Monsieur le Professeur Gilles Foucras,

Qui nous a fait l'honneur de diriger cette thèse. Pour sa disponibilité et ses conseils tout au long de l'élaboration de ce travail.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de ma respectueuse considération.

Monsieur le Professeur François Schelcher,

Qui a accepté d'être notre assesseur de thèse.

Sincères remerciements.

Monsieur Didier Raboisson,

Qui m'a accompagné dans cette étude, pour m'avoir proposé de travailler sur ce sujet, pour son aide précieuse et son soutien sur ce travail.

Sincères remerciements.

A **Christian** et **Cécile**, avec qui ce fut un plaisir de travailler. Merci pour votre aide, vos conseils et votre gentillesse.

A **mes parents**, pour votre soutien permanent, pour m'avoir toujours donné les moyens de réussir, et pour tout l'amour que vous me donnez.

A **Mamie**, qui a toujours été là pour moi et dont les gaufres sont connues jusqu'à Toulouse !

A **Laure, Laurent** et **Bastien**, pour toutes les nuits squattées dans les Pyrénées ! On vous attend avec le tripoux et l'aligot !

A **Chantal, Didier, Elodie et Céline**

Et à toute ma famille, tatie, tontons, cousins, cousines que je n'oublie pas !

A **Rhymbow**, pour tous les délires qui ne font rire que deux personnes, toutes ces bonnes blagues, les randos chargés comme des mules, les férias et jean passe !

A **Beubeuille**, et toutes les bailles avec lesquelles tu as crocheté les piatanes, les soirées langues de pute, tes dents en intérim, le polident que tu as failli laisser aux urgences, les soirées langues de pute, tes dents en intérim... *J'ai pris un tampon ou quoi ?*

A **Bali**, et les vacances en punto, les sorties vtt, pour avoir accepté de partir en rando sous une bâche. Pour ta passion des cèpes et autres champignons en tout genre, et pour toutes les patates que tu as eu la gentillesse de nous faire cuire en fin de boom ...même si c'est long à cuire les patates! sSSsss.....

A **Fabien**, ses fameuses patates, son beurre et sa tequila (mexicaine bien entendu !) Pour les préchauffes T1bis, et jean repasse !

A **Claire** et **MB**, et à la patience des voisins de la place St Georges (non pas toi Bali !). Pour m'avoir fait découvrir l'art (Dali c'est presque comme Bali !), le Bujan, les châteaux ariégeois, Denver qui imite un ornithorynque etc...

A **Marion** et son mégaphone !

A **Miloute**, **Guigui**, **Mélo**, **Flunchynette**, et à tous les connards,

A **Rominou** et les sales d'activités,

A **Allain** et son beau camion ! et tout le temps passé à peser, défumer, repeser, pipeter, faxer.

A **Didier**, qui a toujours une pièce sur lui en boom pour prendre "juste une bière" ! +

A **JM**, « putain Jean-Marie ! », la Playstation et les cannes à pêche sont prêtes !

A **Julie**, et ses talents de chanteuse que rien n'arrêtera !

A **Dumé**, Oulala Oulala-lala ! Pour cette super année et ce magnifique Noël (entre autres) !

Au **troisième étage du bâtiment C**, pour les préchauffes couloir, les voleurs de vodka et la fragilité des faux plafonds, la salle de schatque / playstation / coupe du monde / préchauffe dans laquelle nous avons beaucoup « révisé » !!

Aux **Gerso**is et l'armagnac !

A **Adri, Séb, Julie, Julien, Titi** et tous les potes de Pailhac ! Pour toutes les soirées, et les fêtes de village made in Las Vegas ! Il paraît qu'une nouvelle voie a été ouverte versant Sud de l'Arbizon, je suis impatient de la voir !!! Et au petit dernier de Pailhac !

Au **service de bovine**, pour tout ce que vous avez pu m'apprendre,

A **Jean-Marc, Adrian, Didier de Trie**, qui m'ont accueillis régulièrement à bras ouverts.

Aux **vétos d'Espalion**, pour votre super accueil et tout ce que vous m'apprenez.

Au cercle et à **Lulu**,

A tous ceux qui sont partis mais qui sont à jamais dans mon cœur.

Le meilleur pour la fin, à ma puce **Marie**, que j'aime le plus au monde et qui me comble de bonheur chaque jour !! Tu fais de moi l'homme le plus heureux du monde!!

Table des Matières

I. Introduction.....	19
A. Granulocytes neutrophiles et immunité anti-bactérienne.....	21
1. Biologie des neutrophiles bovins.....	22
a. Numération leucocytaire.....	22
i. Variations liées à l'âge.....	23
ii. Variations liées au stade physiologique.....	24
iii. Variations liées au stress.....	24
b. Morphologie d'un granulocyte neutrophile bovin mature.....	25
c. Cycle de vie des GNN.....	26
i. Origine des GNN.....	26
ii. Une mort programmée.....	27
2. Fonctions des granulocytes neutrophiles.....	28
a. Chimiotactisme.....	28
i. Signaux chimiotactiques.....	28
ii. Migration guidée par les molécules chimiotactiques.....	32
b. Reconnaissance de l'agent pathogène.....	36
i. Via les récepteurs Toll-like (TLR).....	36
ii. Opsonisation.....	37
iii. Reconnaissance non immunologique.....	37
c. La phagocytose.....	38
d. Le système de production des formes réactives de l'oxygène.....	41
3. Facteurs de variation de l'activité neutrophilique.....	45
B. Métabolisme de l'azote chez les bovins.....	49
1. Digestion de l'azote, système PDI (Protéines Digestibles dans l'Intestin).....	49
a. Le milieu ruminal.....	49
b. Digestion microbienne de l'azote alimentaire.....	50
c. Le système PDI.....	53
i. Valeur PDIA.....	54
ii. Valeur PDIM.....	54
d. Equilibre PDI des rations.....	56
2. Les flux d'azote inorganique.....	60

a.	Nature des métabolites et cycle de production	60
b.	Sources de variation	66
i.	Excès de PDIN.....	66
ii.	Fréquence des repas	66
c.	Effets biologiques connus ou supposés.....	67
i.	Déficit azoté	67
ii.	Excès azoté.....	67
II.	Matériels et méthodes	71
1.	Lieu de l'étude.....	71
2.	Animaux	71
3.	Prélèvements sanguins.....	73
a.	Immunologie	73
i.	Prélèvements sanguins.....	73
ii.	Numération et formule sanguine	73
b.	Biochimie	74
i.	les gaz sanguins	74
ii.	Ammoniémie	75
iii.	Archivage	76
iv.	Autres analyses.....	76
4.	Purification des neutrophiles	77
5.	Principes de la cytométrie en flux.....	77
6.	Analyse de l'expression des récepteurs membranaires	79
a.	Expression de CD11b et CD62L.....	79
7.	Evaluation de la diapédèse	79
8.	Evaluation de la phagocytose	80
9.	Analyse de la bactéricidie.....	81
a.	Préparation des réactifs	81
10.	Analyse statistique	82
a.	Effet instantané	83
b.	Effet cumulatif	83
c.	Autres modèles :	83
III.	Résultats.....	85
1.	Pureté des isollements cellulaires.....	85
a.	Analyse statistique	87

i. Effet instantané	87
ii. Effet cumulatif	87
2. Expression des récepteurs membranaires	88
a. Expression du marqueur CD11b.....	88
b. Expression de la L-sélectine CD62L	89
i. Analyse statistique	90
3. Diapédèse	93
a. Effets instantanés	94
b. Effets cumulatifs	96
4. Phagocytose	97
a. Effets instantanés	99
b. Effets cumulatifs	99
c. Autres modèles.....	99
5. Bactéricidie.....	100
6. Bilan des effets.....	101
IV. Discussion	103
V. Conclusion.....	113

Table des illustrations

Figure 1 : Les différentes voies d'activation du complément.	30
Figure 2 : Principaux récepteurs membranaires des neutrophiles.....	33
Figure 3 : Les étapes d'adhésion et de migration des GNN à travers l'endothélium vasculaire.	35
Figure 4 : Opsonisation des bactéries par des antigènes et les molécules du complément.....	37
Figure 5 : Les principaux composants des granules cytoplasmiques des neutrophiles et leurs fonctions	40
Figure 6 : Activation de la NADPH oxydase	44
Figure 7 : Dégradation des composés azotés dans le rumen.....	52
Figure 8 : Schéma simplifié du devenir des matières azotées dans le rumen	53
Figure 9 : Schéma récapitulatif du calcul des valeurs PDIA, PDIMN, et PDIME d'un aliment.....	55
Figure 10 : Notion de PDIME et PDIMN.	55
Figure 11 : Valeur PDI des principales matières premières.....	57
Figure 12 : Chronologie de la mise à disposition d'énergie et d'azote pour la microflore ruminale, cas de l'ensilage de maïs.....	61
Figure 13 : Cycle de Krebs Henseleit	63
Figure 14 : Complémentarité de la répartition des mécanismes d'élimination de l'azote dans le foie.	63
Figure 15 : Utilisation métabolique de l'azote et flux d'urée.....	65
Figure 16 : Concentration plasmatique d'urée (UP) chez des vaches recevant différents niveaux d'énergie à différentes fréquences.	66
Figure 17 : Evolution de l'urémie dans les heures suivant une intoxication au tourteau de soja 48 (2% du poids vif)	67
Figure 18 : Conséquences d'un excès d'azote dégradable	70
Figure 19 : Principe de la cytométrie de flux.....	77
Figure 20 : Identification de la population de cellules dont les critères de taille / granulosité correspondent à ceux des neutrophiles.	78
Figure 21 : Schéma du dispositif de mesure de la diapédèse	79
Figure 22 : Plan de plaque du test de diapédèse.	80

Figure 23 : Plan de plaque du test de bactéricidie	81
Figure 24 : Exemple de courbe standard établissant la relation entre la densité optique mesurée et la concentration bactérienne.....	82
Figure 25 : Détermination de la pureté des neutrophiles par cytométrie de flux.	86
Figure 26 : Moyenne mensuelle de la pureté des neutrophiles.	86
Figure 27 : Effets animal et HCO_3^- sur la pureté des neutrophiles.....	87
Figure 28 : Effets animal et Cu sur la pureté des neutrophiles	88
Figure 29 : Expression de la sous unité CD11b.....	88
Figure 30 : Moyenne mensuelle de la MFI CD11b par animal.....	89
Figure 31 : Analyse de la co-expression de CD11b et CD62L à la surface des neutrophiles par cytométrie en flux.....	89
Figure 32 : Moyenne mensuelle de la MFI CD62L pour chaque animal	90
Figure 33 : Expression de CD62L en fonction de l'urémie	91
Figure 34 : Effets animal, mois et HCO_3^- sur l'expression de CD62L.....	91
Figure 35 : Effets animal, mois et trou anionique (AG = Anion Gap) sur l'expression de CD62L.	92
Figure 36 : Effets animal, mois et AGNE sur l'expression de CD62L.	92
Figure 37 : Ajustement de la première fenêtre graphique.....	93
Figure 38 : Analyse de la diapédèse spontanée.....	94
Figure 39 : Etude de la corrélation entre la diapédèse spontanée et la valeur d'ammoniémie	95
Figure 40 : Etude des corrélations entre l'ammoniémie et la diapédèse spontanée... ..	95
Figure 41 : Etude des capacités de diapédèse spontanée (DiapMed) en fonction du glucose. Effets Animal, Mois et Glucose	96
Figure 42 : Etude des capacités de diapédèse spontanée (DiapMed) en fonction de la T4. Effets Mois et T4	97
Figure 43 : Analyse de la phagocytose par cytométrie en flux.....	98
Figure 44 : Etude des capacités de phagocytose en fonction de la T4.....	99
Figure 45 : Moyenne des pourcentages de neutrophiles ayant phagocyté en fonction de la ration ingérée.....	100
Figure 46 : Intensité de la bactéricidie en fonction de la ration	101
Figure 47 : Voies d'activation des neutrophiles et production de radicaux	112

Photo 1 : Neutrophile bovin, microscopie optique grossissement x 1250.....	25
Photo 2 : Neutrophile bovin en microscopie électronique.....	25
Tableau 1 : Valeurs usuelles des leucocytes bovins.....	22
Tableau 2 : Variation des paramètres hématologiques selon l'âge chez des vaches Prim'Holstein saines.....	23
Tableau 3 : Apports PDIA, PDIE, PDIN de la luzerne, du tourteau de soja 48, du maïs et de l'urée.....	57
Tableau 4 : Composition des rations	72
Tableau 5 : Succession des rations pour chaque animal durant l'étude.....	72
Tableau 6 : Corrélations révélées par l'analyse statistique.....	101

Liste des abréviations

Ac : Anticorps.

Ag : Antigène.

AGV : Acides Gras Volatils.

ANP : Azote non Protéique.

CD : Classe de différenciation

CFU-GM : Unité de formation de colonie commune aux granulocytes et aux macrophages.

CR : Récepteurs du complément.

dr : digestibilité réelle.

DT : Dégradabilité Théorique.

EDTA : Ethylène Diamine Tétracétique

fMLP : Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine.

FRO : Formes Réactives de l'Oxygène.

GDA : système Glutamate Déshydrogénase Aminotransférase.

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor.

GNN : Granulocytes Neutrophiles.

ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1.

IFN- γ : Interféron γ .

Ig : Immunoglobulines.

IL : Interleukine

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif.

JAM : Junctional Adhesion Molecule.

LPS : Lipopolysaccharide.

LTB₄ : Leucotriène B₄.

MADég : Matière Azotée Dégradable.

MAM : Matière Azotée d'origine Microbienne.

MAnonDég : Matière Azotée non Dégradable.

MAPK : MAP kinases.

MAT : Matière Azotée Totale.

MFI : Mean Fluorescence Intensity

MG : Matières Grasses.

MOD : Matière Organique Digestible.

MOF : Matière Organique Fermentescible.

MPO : Myéloperoxydase.

OZP : Oponized Zymosan

PAF : Platelet-Activating Factor.

PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns.

PDI : Protéines Digestibles dans l'Intestin.

PDIE : Protéines réellement Digérées dans l'Intestin permises par l'Energie.

PDIM : Protéines réellement Digérées dans l'Intestin d'origine Microbienne.

PDIME : quantité de Protéines réellement Digérées dans l'Intestin d'origine Microbienne permise par l'Energie.

PDIMN : quantité de Protéines réellement Digérées dans l'Intestin d'origine Microbienne permise par l'Azote.

PDIN : Protéines réellement Digérées dans l'Intestin permises par l'Azote.

PF : Produits de Fermentation.

Pi3-K : Phosphatidyl inositol3-Kinase.

PIA : Protéines Intestinales d'origine Alimentaire.

PIM : Protéines Intestinales d'origine Microbienne.

PKC : Protéines Kinases C.

PMA : Phorbol Myristate Acetate.

PRR : Pattern Recognition Receptors.

SOD : Superoxyde Dismutase.

TLR : Toll Like Receptor.

TNF α : Tumor Necrosis Factor- α .

UF : Unité Fourragère.

I. Introduction

Les pathologies infectieuses sont à l'origine de pertes économiques élevées dans les élevages de ruminants. Les conditions de traite, de logement, d'ambiance sont de mieux en mieux maîtrisées ; pourtant certaines situations sont toujours à l'origine d'une fréquence élevée de ces pathologies. On assiste par exemple fréquemment à une augmentation de l'apparition de mammites ou de métrites lors de la mise à l'herbe, à un moment où les excès d'azote soluble alimentaire sont particulièrement fréquents.

Cette augmentation des maladies infectieuses pourrait trouver son explication dans une modification de plusieurs facteurs, dont des facteurs alimentaires. Les agents pathogènes, qui sont les facteurs déterminants des infections mammaires, peuvent constituer un réservoir mammaire, environnemental ou mixte. Une augmentation des mammites en relation avec un réservoir mammaire suppose un changement délétère de la maîtrise de l'hygiène de traite. Le passage d'une aire paillée à un parcours extérieur (mise à l'herbe) suppose une diminution de la densité des animaux et diminue le risque lié à un réservoir environnemental. Le milieu, qui est un facteur favorisant dans l'étude des mammites, ne semble pas être impliqué dans l'augmentation de ces pathologies.

Par contre, la nutrition des animaux, un des facteurs prédisposants, pourrait être impliquée dans l'apparition de ces pathologies survenant peu de temps après ce changement alimentaire. La résistance des animaux peut aussi être mise en cause, et plus particulièrement la capacité des cellules immunitaires à éliminer les agents infectieux. En présence d'un agent pathogène, la réactivité du système immunitaire pour l'éliminer est primordiale afin d'empêcher l'apparition des signes cliniques. Une diminution des capacités de défense cellulaires pourrait être à l'origine de l'augmentation de la pathologie d'origine infectieuse.

Mais pourquoi les cellules immunitaires seraient-elles moins efficaces ? Une hypothèse avancée fait intervenir la composition de la ration. En effet, la mise à l'herbe s'accompagne d'une augmentation de la teneur en matière azotée totale dans la ration qui se traduit par des modifications sur le plan métabolique. Par exemple, l'augmentation d'azote soluble dans la ration entraîne une augmentation de la production d'ammoniac dans le rumen et une augmentation de la production d'urée par le foie. Ces métabolites ont des effets néfastes en matière de reproduction ; ils

entraînent en effet une diminution du pH utérin ce qui diminue la survie des spermatozoïdes, ont une action sur la sécrétion hormonale (diminution de la sécrétion de progestérone et de prostaglandines F_{2α}), et sont à l'origine d'une cytotoxicité pour l'embryon, le fœtus et les spermatozoïdes.

Ces métabolites pourraient aussi avoir des conséquences sur les fonctions des cellules immunitaires. En médecine humaine, l'étude de patients souffrant d'insuffisance rénale montre que l'urémie associée à ces situations pathologiques est à l'origine de dysfonctionnements des granulocytes neutrophiles, cellules immunitaires ayant un rôle crucial dans l'élimination des agents pathogènes. D'autres études de laboratoire semblent aussi indiquer un rôle néfaste de l'urée et de l'ammoniac sur les fonctions immunitaires.

L'effet négatif des métabolites de l'azote est donc fortement suspecté et c'est pourquoi nous avons étudié la réponse des neutrophiles dans le cas de différentes rations isoénergétiques, dont la teneur en matière azotée totale était croissante.

Dans une première partie, nous détaillerons les mécanismes d'élimination des agents pathogènes par le système immunitaire. Nous limiterons cette étude aux polynucléaires neutrophiles qui, même s'ils ne sont pas les seuls effecteurs, ont un rôle central dans la réponse innée de l'immunité et participent aux premiers mécanismes de défense. Puis, dans une seconde partie, nous détaillerons le métabolisme de l'azote afin de faire le lien entre la ration ingérée par les ruminants et les métabolites suspectés d'influencer la réponse immunitaire.

A. Granulocytes neutrophiles et immunité anti-bactérienne

D'après *Carl Nathan (2006)*, la fonction du système immunitaire est de prévenir l'invasion de l'organisme par des génomes autres que celui encodé dans la lignée germinale. L'importance des leucocytes dans la réponse aux infections est connue et étudiée depuis longue date. Dès 1841, Addison étudie les leucocytes du sang et des tissus inflammatoires et évoque déjà la capacité de diapédèse des leucocytes. L'étude de l'immunité est généralement séparée entre la réponse innée et la réponse adaptative, même si cette dichotomie est probablement très artificielle.

Les monocytes, leucocytes mononucléaires, jouent un rôle important dans les deux types de réponse ; ils ont la capacité de migrer sur le site de l'infection, de phagocyter et d'éliminer les agents pathogènes. D'autre part, ils sont capables de présenter les antigènes et participent ainsi à la réponse adaptative.

Les granulocytes neutrophiles (**GNN**), leucocytes dont le noyau apparaît fragmenté, jouent un rôle prépondérant dans la réaction inflammatoire et dans le déroulement de la réponse immunitaire. Leur activité anti-bactérienne est avérée (*Malech 2007*). Ils sont capables de s'accumuler plus rapidement sur le site inflammatoire que les monocytes, et leur explosion métabolique est beaucoup plus forte. De ce fait, ils sont l'une des premières barrières de défense contre la plupart des agents pathogènes qui franchissent la barrière cutané-muqueuse. On les retrouve dans le sang et dans les tissus. Leur courte durée de vie (quelques jours), leur a valu une certaine ignorance de la part des immunologistes, mais des découvertes récentes les placent comme l'un des pivots de l'immunité innée (*Hoebé 2004*). Ces cellules ont gagné un grand intérêt dans différents domaines de la recherche médicale. En médecine bovine, les neutrophiles sont très étudiés pour leur rôle barrière contre les infections de la mamelle (*Paape 2002*).

Ainsi, même si les neutrophiles ne sont pas les seuls effecteurs de la défense de l'organisme face aux agents pathogènes, leur rôle est crucial et incontestable.

Nous décrirons successivement la biologie des neutrophiles bovins puis leur fonction dans l'immunité antibactérienne.

Cette partie n'a pas pour but de décrire exhaustivement toute la biologie et la physiologie des granulocytes neutrophiles, mais uniquement de faire le point sur des aspects essentiels à la compréhension de la démarche et du résultat de nos recherches.

1. Biologie des neutrophiles bovins

a. Numération leucocytaire

Pour se prémunir efficacement contre les infections, l'organisme a besoin d'une quantité suffisante de cellules effectrices.

Contrairement à de nombreuses espèces chez lesquelles les GNN représentent la plus grande part des leucocytes sanguins, les GNN bovins représentent 15-35% de la quantité totale de leucocytes (cf. tableau 1). Cependant, si l'on considère le volume sanguin d'un bovin adulte (8% du poids vif), le nombre total de GNN circulants dépasse 5×10^{11} cellules.

Dans les conditions physiologiques, aux GNN circulants, il faut ajouter les GNN marginalisés, c'est-à-dire adhérents à la paroi vasculaire. Ils représentent 50 à 60% des GNN présents dans les vaisseaux (*Paape 1974*).

Tableau 1 : Valeurs usuelles des leucocytes du sang chez le bovin adulte, (d'après Radostits 2007)

	Valeur usuelle ($10^9/L$)	%
Leucocytes	4,0-12,0	
Neutrophiles dont segmentés	0,6 - 4	28 (15-45)
Neutrophiles non segmentés	0- 0,1	
Lymphocytes	2,5 – 7,5	58 (45-75)
Monocytes	0,25 – 0,8	4 (2-7)
Eosinophiles	0 – 2,4	9 (0-20)
Basophiles	rare	0.5 (0-2)

Il existe deux types de neutrophiles circulants : les neutrophiles segmentés, GNN matures, et les non segmentés ou « band cells » qui sont des GNN immatures. On parle de neutrophiles segmentés pour les neutrophiles dont le noyau est plurilobé et apparaît comme segmenté en microscopie.

En 1904, Arneth a montré que le nombre de lobes du noyau permet de déterminer un index de maturation des neutrophiles. Les cellules immatures possèdent en effet un noyau non segmenté (band cells), et plus le stade de maturation du neutrophile augmente, plus les lobes du noyau sont marqués et nombreux.

i. Variations liées à l'âge

Le nombre de neutrophiles n'est pas le même selon l'âge de l'animal. En effet, la formule sanguine du veau naissant est différente de celle de l'adulte ; en outre elle est fortement influencée par la mise bas. En effet, une hypercortisolémie fœtale précède et initie la mise bas (*Alsemgeest 1993*). Elle induit une leucocytose dont les principales composantes sont une neutrophilie ($8-10 \cdot 10^9/l$) et une lymphopénie ($<3 \cdot 10^9/l$). On observe alors un rapport Neutrophiles : Lymphocytes supérieur à 2 :1 qui s'inverse dans les premières semaines de vie en raison de la diminution du nombre de neutrophiles circulants et de l'augmentation simultanée de celui des lymphocytes.

Le tableau 2 présente l'évolution des paramètres hématologiques et du nombre de neutrophiles dans la race Prim'Holstein.

Tableau 2 : Variation des paramètres hématologiques selon l'âge chez des vaches Prim'Holstein saines, (d'après Jain 1993)

Age	GR ($10^{12}/l$)	Leucocytes ($10^9/l$)	Lymphocytes ($10^9/l$)	Neutrophiles ($10^9/l$)
1-6 mois	13,10	8,7	4,6	3
6-12 mois	10,65	7,7	6,3	0,8
1-2 ans	9,15	9	5,9	2,3
2-3 ans	7,50	9,4	5,3	2,1
3-4 ans	8,7	7,7	4,6	1,9
4-6 ans	7,89	7,5	4	1,8
6-14 ans	7,47	6,9	4,25	1,8

ii. Variations liées au stade physiologique

Il existe aussi des variations du nombre de neutrophiles circulants en fonction du stade physiologique des animaux. Ainsi, pendant la gestation, lorsque la progestéronémie est maximale, le nombre de GNN immatures augmente dans le sang (*Moreira da Silva 1998*).

Certaines affections, telles que la stéatose hépatique consécutive à la gestation, peuvent avoir un effet notable sur les fonctions des GNN. Cependant la variabilité interindividuelle est très forte et les résultats difficiles à généraliser (*Zerbe 2000*).

Ainsi, selon le stade physiologique, des variations du nombre de GNN et de leurs capacités fonctionnelles sont à noter. L'importance de ces variations est cependant très fortement influencée par des variations individuelles.

iii. Variations liées au stress

Un stress physique ou émotionnel, un effort physique intense sont respectivement responsables d'une leucocytose dite physiologique et d'un leucogramme de stress, par opposition à la leucocytose réactive en réponse à l'inflammation ou à l'infection (*Jain 1993*). Ces modifications sont sous la dépendance de l'action de l'adrénaline et du cortisol endogène.

Dans le cas de la leucocytose physiologique, l'adrénaline provoque une contraction de la rate, et par voie de conséquence une libération d'érythrocytes, ainsi que la démarginalisation des leucocytes (GNN et/ou lymphocytes). L'augmentation des GNN n'excède pas le double des valeurs usuelles maximales et la proportion de granulocytes immatures n'est pas modifiée. Cet effet, transitoire, disparaît généralement dans les 30 minutes qui suivent la disparition du stimulus.

Les modifications résultant de l'hypercortisolémie associée à un stress sont beaucoup plus marquées. La démarginalisation des neutrophiles, la diminution de la diapédèse des GNN et la libération des GNN matures en réserve dans la moelle osseuse provoquent dans les 4 à 8 heures une neutrophilie pouvant atteindre 12×10^9 cellules/l ; elle persiste jusqu'à 72 heures après l'arrêt du facteur déclenchant. Cette neutrophilie ne s'accompagne généralement pas de l'apparition de cellules immatures. A l'inverse, la séquestration des lymphocytes dans les tissus lymphoïdes provoque une lymphopénie marquée. Par conséquent, le nombre de leucocytes totaux est

rarement augmenté, le plus souvent diminué, et le seul fait marquant est une augmentation du rapport Neutrophiles/Lymphocytes (*Jain 1993*).

b. Morphologie d'un granulocyte neutrophile bovin mature

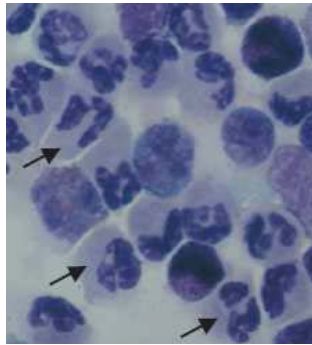


Photo 1 : Neutrophile bovin, microscopie optique, grossissement x 1250 (source : *Paape et al., 2003*) les flèches montrent des neutrophiles dont le noyau est segmenté.

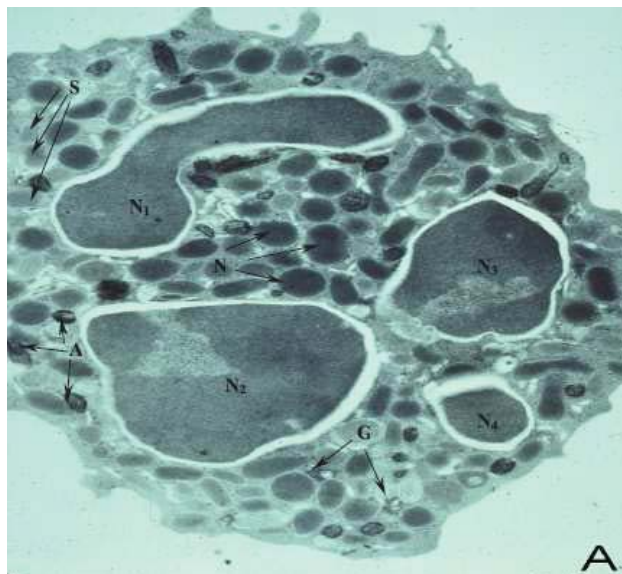


Photo 2 : Neutrophile bovin en microscopie électronique, (source : *Paape et al., 2003*)
Légende : N1 à N4 = noyau plurilobé, G = granules de glycogène, S = granules spécifiques, A = granulations primaires azurophiles.

Les GNN matures sont reconnaissables en microscopie optique grâce à leur noyau segmenté (Photo 1). La lobulation du noyau est marquée. En effet, l'alignement

des lobules en ligne droite est supposé faciliter la diapédèse entre les cellules endothéliales.

En microscopie électronique (Photo 2), on remarque la présence, dans le cytoplasme d'un GNN mature, en plus du noyau polylobé (N1-N4), des grains de glycogène (G), des granules spécifiques (S), des granulations primaires azurophiles (A), et des vésicules sécrétoires (N).

Les GNN immatures sont les myélocytes, métamyélocytes et neutrophiles non segmentés (band cells). Ces derniers peuvent être retrouvés dans le sang. Ils sont reconnaissables à leur noyau en forme de fer à cheval. Les autres stades sont normalement retrouvés dans la moelle osseuse où se situe la première phase de la vie du GNN.

c. Cycle de vie des GNN

Trois phases se succèdent dans la vie d'un neutrophile. Ce sont les phases intramédullaire, circulatoire et tissulaire. La première permet à partir d'une cellule souche d'obtenir un GNN circulant prêt à intervenir en cas d'infection. Le GNN circulant traverse ensuite l'endothélium vasculaire pour gagner le site de l'inflammation et exercer ses facultés de défense de l'organisme. Ce cycle de vie est très court (7-10jours) par comparaison à d'autres types cellulaires.

i. Origine des GNN

La phase intramédullaire comprend les cellules en prolifération, en maturation et les neutrophiles de réserve. Les GNN proviennent d'une cellule souche multipotente qui donnera naissance successivement à une cellule souche myéloïde, à un progéniteur mixte des granulocytes et des monocytes-macrophages (**CFU-GM**), à un progéniteur de la lignée granuleuse qui se transforme en myéloblaste, puis en promyélocyte et en myélocyte (*Jain 1993*, et *Tizard 1996*). Le neutrophile acquiert alors progressivement des marqueurs membranaires de différenciation (**CD** = classe de différenciation).

La maturation du GNN consiste en l'apparition successive des granulations azurophiles (primaires) dans les promyélocytes. Les granulations spécifiques (secondaires), qui définissent le type de polynucléaire (ici neutrophile) apparaissent au

stade myélocyte. Les vésicules sécrétoires apparaissent plus tardivement vers la fin de la maturation.

En moyenne, un GNN mature gagne le sang en 7 jours chez le veau (*Valli 1971*). Le phénomène de passage du compartiment granulopoïétique de la moelle osseuse vers le sinus veineux est appelé diabase. Le lit vasculaire de la moelle osseuse est une paroi trilaminaire :

- une couche luminale constituée d'un endothélium linéaire forme une barrière sélective entre la moelle osseuse et le sang
- une couche médiale fenêtrée
- une couche externe formée de cellules phagocytaires (*Mazo 1999*).

La sortie des GNN en dehors de la moelle osseuse est conditionnée par :

- la perméabilité de la barrière aux cellules
- la capacité des GNN à négocier les fenêtres des couches cellulaires
- des modulateurs chimiques ou physiques qui agissent sur la perméabilité de la barrière ou directement sur les GNN (*Monfardini 2004*).

Les neutrophiles matures gagnent alors le courant circulatoire dans lequel ils circulent peu de temps (demi-vie de 8,9 jours) (*Carlson 1975*).

ii. Une mort programmée

Dans les conditions physiologiques, les neutrophiles circulants non utilisés meurent par apoptose. L'apoptose est décrite comme une mort cellulaire programmée, physiologique suite à un signal de mort. Elle se caractérise morphologiquement par la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire et le rétrécissement cellulaire (*Reed 2000*). La cellule apoptotique est alors phagocytée par les macrophages.

Ainsi le contenu protéolytique du neutrophile n'est pas déversé dans la circulation, ce qui évite le déclenchement d'un processus inflammatoire. Ceci permet de réguler de façon adéquate le nombre de neutrophiles circulants et constitue un élément clé de l'homéostasie sanguine.

Le mécanisme d'apoptose est modulé par certaines cytokines ou par des interactions cellulaires (FAS/FAS-L par exemple). Ainsi l'interleukine-8 (**IL-8**) ou l'interféron- γ (**IFN γ**) prolongent la durée de vie des GNN humains. A l'inverse, le **TNF α** (Tumor Necrosis Factor- α) induit l'apoptose de GNN humains ou bovins. Le lipopolysaccharide (**LPS**) est aussi connu pour inhiber le mécanisme d'apoptose (*Paape 2003*).

2. Fonctions des granulocytes neutrophiles

Les GNN matures qui ont gagné le courant circulatoire sont physiologiquement au repos. Sous l'influence de différents stimuli provenant d'un foyer infectieux ou inflammatoire, les GNN adhèrent aux cellules endothéliales, se glissent entre celles-ci (par le phénomène désigné par le terme de **diapédèse**) pour se diriger de façon orientée vers leur cible tissulaire (**chimiotactisme**) (*Tizard 1996*). Une fois le contact et la reconnaissance effectués, le neutrophile joue son rôle de **phagocyte**. L'activation du GNN entraîne la dégranulation et la formation de puissantes formes réactives de l'oxygène qui contribue à tuer l'agent pathogène (**bactéricidie**). L'activation du GNN entraîne aussi la **production de cytokines et de chemokines**. La durée de vie tissulaire d'un GNN est de 3 jours au maximum (*Malech 2007*).

a. Chimiotactisme

Afin de recruter les cellules effectrices de l'immunité, des signaux sont envoyés depuis le site infectieux, d'une part par les agents infectieux, et d'autre part par les cellules (immunitaires ou non immunitaires).

i. Signaux chimiotactiques

Ces médiateurs ont pour rôle de constituer un gradient chimique et ainsi de guider les GNN jusqu'au foyer infectieux ; ce processus s'appelle le chimiotactisme. Différents LPS de bactéries Gram négatives, les composants du complément C5a et C3a, le leucotriène B₄ (**LTB₄**), les interleukines (**IL**)-1, -2 et -8 sont de puissants

chimioattractants (*Persson 1993*). Ces substances se lient à des récepteurs spécifiques présents sur la membrane plasmique du neutrophile.

◇ **Le complément**

La majorité des protéines du complément sont synthétisées dans le foie. Elles circulent sous forme inactive dans le plasma. Lors d'infection, des activations en cascade se produisent et aboutissent à la formation d'un complexe d'attaque membranaire permettant la lyse bactérienne. Aussi, les protéines activées dans les voies d'activation ont des rôles divers. Il existe trois voies d'activation du complément :
Figure 1.

- la voie classique
- la voie des lectines
- la voie alterne

La voie classique est activée par la présence de complexes antigène/anticorps.

La voie des lectines est quant à elle activée par la fixation d'une lectine à la surface des agents microbiens. Les activations en cascade qui en découlent permettent l'activation de la protéine C3.

La voie alterne est activée par l'adhésion du facteur C3 aux protéines bactériennes. Là aussi, la cascade de réactions active la protéine C3.

Le clivage de C3 va alors permettre la production de C3a et C3b. Le C3a est une anaphylatoxine qui stimule la chimiotaxie, la dégranulation des mastocytes et des éosinophiles. Le fragment C3b et ses produits de clivage iC3b et C3d se fixent à la surface des pathogènes et sont reconnus par les récepteurs du complément (**CR**) exprimés à la surface des cellules immunitaires. Cette fixation entre le pathogène et les molécules du complément, ou opsonisation, facilite la phagocytose et la destruction des pathogènes (*Brown 1991*).

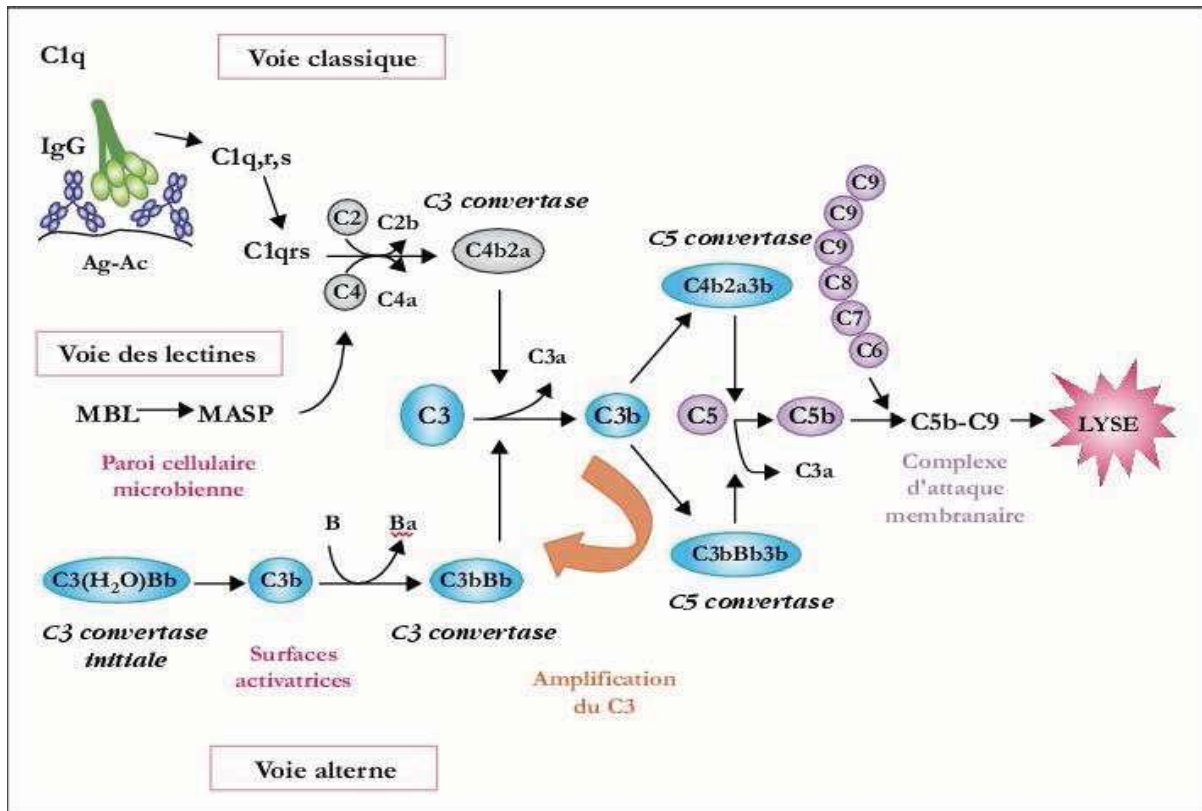


Figure 1 : Les différentes voies d'activation du complément. (Probst 2006). La voie classique est induite par la liaison du C1q aux complexes antigène-anticorps (Ag-Ac), tandis que la voie alterne est induite par la liaison du C3b aux surfaces activatrices. La voie des lectines est induite par la liaison d'une lectine spécifique des mannanes (MBL, mannose-binding lectin) à la surface de certains agents pathogènes. Toutes ces voies génèrent des C3 convertases (C4b2a et C3bBb), des C5 convertases (C4b2a3b et C3bBb3b) responsables de la formation de C3b et C5b, respectivement. Par sa propriété à engendrer une C3 convertase, le C3b permet l'amplification du C3. Le C5b lié à la cible est converti en un complexe d'attaque membranaire par une séquence de réactions terminales commune aux trois voies. Les flèches simples indiquent les étapes de la réaction, tandis que les flèches en trait gras indiquent l'activité enzymatique ou activatrice.

Le complexe CD11b/CD18 (**CR3**), principalement exprimé sur les monocytes, les macrophages et les neutrophiles, lie le iC3b.

Le fragment C5a provoque la chimiotaxie, la dégranulation, la production de formes réactives de l'oxygène et l'adhésion des granulocytes (neutrophiles, basophiles, éosinophiles), monocytes, macrophages. Le C5a augmente l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (Gerard 1991, Gerard 1994).

◇ **Les peptides bactériens**

Les peptides formylés sont des di- et tri- peptides d'origine bactérienne. Le plus connu d'entre eux est la formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (**fMLP**) car il a un effet

chimioattractant caractéristique sur les granulocytes neutrophiles, ainsi que sur les monocytes.

◇ **Les médiateurs lipidiques**

Le LTB₄ est un puissant agent chimiotactique des neutrophiles (*Palmer 1980*) et des monocytes/macrophages. Il modifie la perméabilité vasculaire et favorise l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales. Le LTB₄ augmente la capacité phagocytaire des macrophages (*Mancuso 1998, Wirth 1985*) et des neutrophiles, via les récepteurs du complément (*Mancuso 2001*).

Le « platelet-activating factor » (**PAF** – Protéine activatrice des plaquettes) produit par les cellules endothéliales reste accroché à la surface de ces cellules et active les neutrophiles (*Camussi 1983, McIntyre 1986*). Il a été montré que le PAF – en plus d'être activateur des plaquettes - est un facteur chimiotactique pour les neutrophiles. Il entraîne une polarisation de la cellule, augmente l'adhésion et la motilité, provoque une mobilisation de calcium intracellulaire et la dégranulation (*Ingraham 1982, McIntyre 1986*).

◇ **Les chimiokines**

L'IL-1 et le TNF α sont produits par les neutrophiles, les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales et les lymphocytes en réponse à de multiples stimuli. L'IL-1 et le TNF α augmentent l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales de la paroi vasculaire favorisant l'adhésion ferme des leucocytes et leur transmigration.

L'IL-8 est connue pour sa capacité à recruter les neutrophiles. Cette chimiokine agit via deux récepteurs (CXCR1 et CXCR2) avec des affinités similaires. Les monocytes, les lymphocytes T, les neutrophiles, les cellules NK (Natural Killer), les cellules endothéliales, épithéliales et les fibroblastes produisent de l'IL-8. Tout comme le LTB₄, le C5a et le fMLF, l'IL-8 provoque une mobilisation de calcium intracellulaire et augmente l'adhésion des cellules par une amplification de l'affinité et de l'avidité des récepteurs d'adhésion (*Detmers 1990, Paccaud 1990*).

Les neutrophiles jouent un rôle central dans l'activation et le bon déroulement de la cascade immunitaire. En effet, ils sont capables d'exprimer des gènes, dont les produits - cytokines et chimiokines – sont étroitement impliqués dans la réponse immunitaire. Ils disposent aussi de récepteurs à certaines cytokines dites proinflammatoires. Ainsi le neutrophile est capable d'émettre des molécules signaux et d'en recevoir, d'où leur rôle central dans la communication des cellules immunitaires.

Les neutrophiles présents au site de l'infection produisent des cytokines, comme l'IL-8, qui recrutent d'autres GNN. Après migration au site infectieux, les GNN stimulés vont à leur tour produire des molécules signaux afin de recruter d'autres cellules immunitaires.

Ils sont capables de produire - entre autres - du $TNF\alpha$ et de l' $INF\gamma$, deux cytokines essentielles dans la différenciation et l'activation des effecteurs du système immunitaire.

Les GNN communiquent donc entre eux et induisent leur recrutement, leur apoptose et leur passage de la moelle osseuse vers le sang. Ils communiquent aussi avec les autres effecteurs du système immunitaire, avec lesquels, ils orientent la réponse immunitaire.

ii. Migration guidée par les molécules chimiotactiques

La migration des neutrophiles est permise par la reconnaissance entre

- d'une part, les molécules chimiotactiques, puis les molécules d'adhésion cellulaire exprimées à la surface des cellules endothéliales,
- d'autre part, les récepteurs membranaires des GNN (qui sont le plus souvent des glycoprotéines exprimées à leur surface).

Les glycoprotéines présentes à la surface des neutrophiles sont classées en marqueurs membranaires de différenciation (**CD**). Il existe plus d'une centaine de molécules, mais trois types sont importants dans les mécanismes de liaison des neutrophiles :

- les récepteurs des fragments constants des immunoglobulines (**CD32** = Fc γ RII)
- les récepteurs du complément (**CD35** = CR1 et **CD11b/CD18** = CR3)

- les molécules d'attachement cellulaire (**CD11a/CD18** et **CD11c/CD18**) (Tizard 1996) (Figure 2)

D'autres récepteurs ont été identifiés et sont impliqués dans les mécanismes permettant l'élimination des pathogènes.

Ainsi, le CD14 membranaire (**mCD14**), exprimé par les GNN et les macrophages (Paape 1996), reconnaît le complexe formé par le LPS et sa protéine ligand (LPS Binding Protein = **LBP**). La liaison mCD14-LPS-LBP entraîne l'activation des GNN (mesuré à travers la libération de TNF- α) et le clivage du mCD14. Ce clivage libère une fraction soluble (**sCD14**) qui interagit avec le LPS bactérien. Le complexe sCD14-LPS se fixe alors sur le TLR-4 exprimé par les cellules endothéliales et déclenche la sécrétion de chimioattractants (IL-8). (Paape 2003)

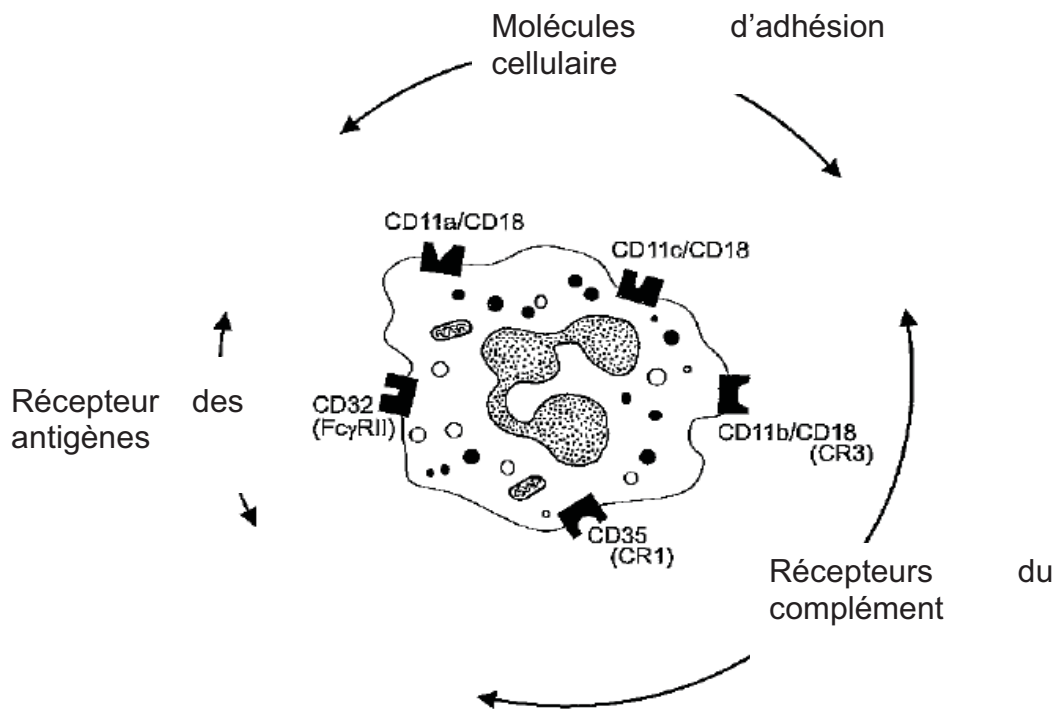


Figure 2 : Principaux récepteurs membranaires des neutrophiles (d'après Tizard 1996)

◇ **Adhésion à l'endothélium**

L'étape préalable à la diapédèse est l'adhésion ferme du GNN à l'endothélium vasculaire. Pour cela, il faut que l'endothélium exprime des molécules d'adhésion à sa surface qui vont servir d'ancrage aux cellules. Cette expression peut être déclenchée

par différents produits bactériens (tels que le LPS) ou par des molécules produites par des tissus endommagés (Tumor Necrosis Factor-alpha **TNF α** , interleukin-1, **IL1**). Ces molécules sont à l'origine de l'expression de glycoprotéines (P-sélectine = **CD62P**) à la surface des cellules endothéliales.

Ces P-sélectines se lient à des molécules exprimées à la surface des neutrophiles : les L-sélectines (**CD62L**).

D'autres sélectines interviennent dans la liaison entre GNN et endothélium : les E-sélectines exprimées par l'endothélium se lient à des glycoprotéines exprimées par les neutrophiles.

Ces liaisons sont de faible affinité. Elles permettent une capture des GNN à la surface de l'endothélium et une réduction de leur vitesse de déplacement (étape de « rolling »). Le GNN « roule » alors sur la paroi endothéliale (Figure 3).

La stimulation du GNN par les cytokines C5a et IL8 se traduit par le détachement des L-sélectines par coupure protéolytique, et l'augmentation de l'expression membranaire des **β 2 intégrines**, en particulier le **CD11b/CD18** (CR3). Le récepteur CD11b/CD18 est un membre de la famille des molécules d'adhésion des leucocytes, référencées aussi comme β 2 intégrines.

Il permet l'attache du GNN à l'endothélium par sa liaison avec d'autres molécules d'adhésion exprimées sur les cellules endothéliales activées, comme **ICAM-1** (Intercellular Adhesion Molecule 1) (Ross 2002). Cette liaison de forte affinité a pour effet l'arrêt du déplacement des GNN préalable à la migration transendothéliale (Paape 2003).

Le complexe CD11b/CD18 (CR3), aussi nommé $\alpha_M\beta_2$ ou Mac-1, joue donc un rôle à la fois dans l'adhésion ferme par son interaction avec ICAM-1, mais aussi dans la liaison et la phagocytose de particules opsonisées par le complément (C3bi). Il sert de récepteur à plusieurs ligands comme le fibrinogène (Altieri 1990), le facteur H (protéine régulatrice de la voie alterne du complément) (DiScipio 1998), le facteur X (Altieri 1988) et le lipopolysaccharide bactérien (**LPS**) (Talamas-Rohanna 1990).

En plus de participer à la reconnaissance de particules opsonisées par le complément, le complexe CD11b/CD18 participe aussi possiblement à la signalisation du CD16b, récepteur de la portion Fc des anticorps (Zhou 1993, Edberg 1994)

D'autres facteurs tels que le PAF sécrété par les cellules endothéliales, sont à l'origine de l'arrêt du GNN. En effet, le PAF augmente l'expression de CD11a/CD18 à la surface du neutrophile ainsi que son affinité pour CD102 (ICAM-2) exprimé à la surface des cellules endothéliales. Ceci contribue à l'attachement des GNN aux cellules endothéliales et le processus de diapédèse peut alors débuter.

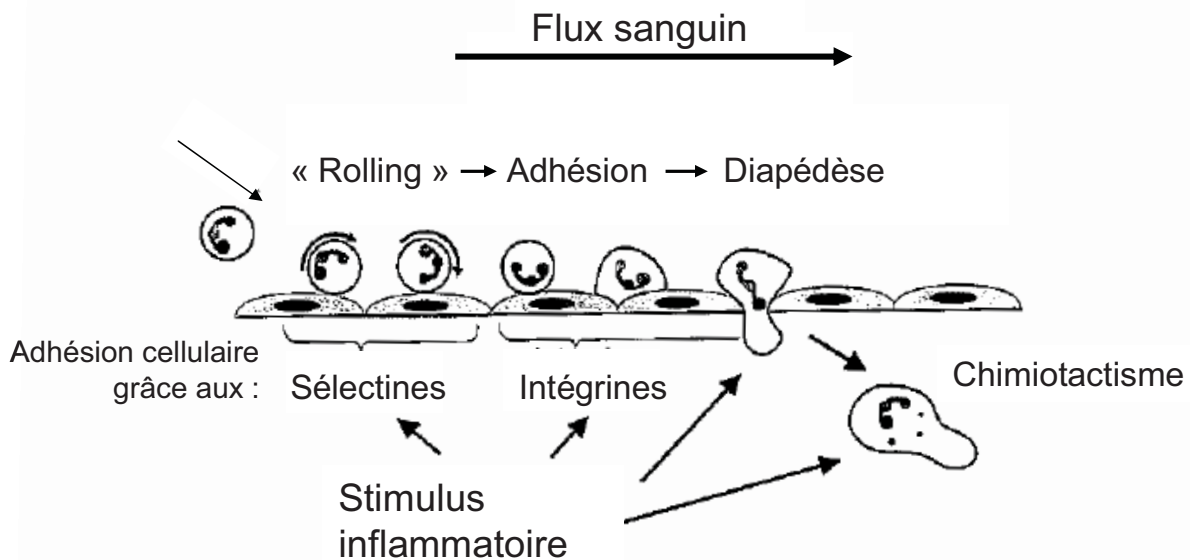


Figure 3 : Les étapes d'adhésion et de migration des GNN à travers l'endothélium vasculaire. Les sélectines capturent les neutrophiles par des liaisons de faible affinité. Les intégrines les accrochent ensuite à l'endothélium par des liaisons fortes, puis les GNN traversent la barrière endothéliale. (d'après Tizard 1996)

◇ **Migration trans-endothéliale**

Les GNN sanguins présents sur l'endothélium vasculaire migrent vers les tissus à travers les jonctions des cellules endothéliales. Cette migration est déclenchée par un signal cytokinique, et la migration du GNN est guidée par un gradient de chimiokines. Dans un modèle proposé par Kubes et coll. (Heit 2002), l'**IL-8** et le **LTB₄** représentent les signaux intermédiaires, c'est-à-dire ceux qui ne se retrouvent pas directement au site inflammatoire, mais qui seront produits par des cellules de l'hôte pour attirer des cellules effectrices. Le **fMLF** et le **C5a** représentent quant à eux les agents terminaux, c'est-à-dire ceux retrouvés dans le site inflammatoire. Les neutrophiles migrent de façon préférentielle vers les agents terminaux plutôt que vers les agents intermédiaires, permettant ainsi au neutrophile de continuer à s'orienter

vers le site inflammatoire malgré la présence de plusieurs agents chimiotactiques dans le milieu.

Ces molécules signaux sont produites à la fois par un tissu lésé et par les cellules immunitaires présentes sur le lieu d'infection/inflammation.

JAM-1 et **JAM-3** (Junctional Adhesion Molecule), exprimés sur les cellules endothéliales, s'associent au complexe CD11a/CD18 et CD11b/CD18 et contribuent à la transmigration des leucocytes (*Chavakis 2004, Ostermann 2002*). Le neutrophile se déplace ensuite dans la matrice extracellulaire en libérant des métalloprotéases et remonte le gradient de molécules chimiotactiques. Celles-ci se fixent sur des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G ce qui provoque une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} et la polymérisation des filaments d'actine. Il en découle une polarisation du GNN dans le sens du gradient des molécules chimiotactiques ; le GNN peut alors par un système de polymérisation / dépolymérisation se déplacer selon ce gradient.

b. Reconnaissance de l'agent pathogène

Avant de phagocyter l'agent pathogène, le GNN doit être activé. Cette activation répond à la reconnaissance de l'agent pathogène par le GNN via ses récepteurs membranaires. La communication cytokinique participe aussi à cette activation.

D'autre part, les bactéries et les GNN étant chargés négativement, l'adhésion entre les deux est difficile. L'opsonisation permet de faciliter la reconnaissance et l'adhésion entre leurs surfaces.

i. Via les récepteurs Toll-like (TLR)

Les **TLRs** (Toll Like Receptors) sont des récepteurs transmembranaires qui font partie de la famille des **PRR** (Pattern Recognition Receptors) et sont présents, entre autres, sur les GNN (*Moller 2005*). Ils jouent un rôle dans la réponse innée par la reconnaissance de motifs conservés sur les pathogènes appelés **PAMPs** (Pathogen Associated Molecular Patterns) (*Underhill 2002*).

L'acide lipotéichoïque (LTA) associé à la paroi des bactéries Gram positif et le LPS des germes gram négatif font partie des PAMPs.

Alors que la partie extracellulaire des TLR est responsable de la liaison avec le PAMP, la partie intracellulaire participe à la transduction du signal (*Akira 2004*). Ainsi la reconnaissance du LTA ou celle du LPS génère un signal intracellulaire qui active le GNN.

ii. Opsonisation

Une reconnaissance immunologique du pathogène appelée opsonisation facilite le contact et la reconnaissance par le phagocyte. Les opsonines sont principalement des immunoglobulines (**Ig**) de type G (IgG2) et des IgM qui se fixent de façon spécifique sur les épitopes de l'agent pathogène (*Paape 2003*). Ces opsonines sont ensuite reconnues par le récepteur Fc des GNN (CD32 = FcγRII) (*Tizard 1996*). (Figure 4)

Les protéines du complément dérivées du C3 qui proviennent de l'activation du complément sont elles aussi capables d'opsoniser la bactérie. Les fractions C3b et iC3b générées se déposent à la surface de la cible et se lient aux récepteurs CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) du GNN (*Nagahata 1997*).

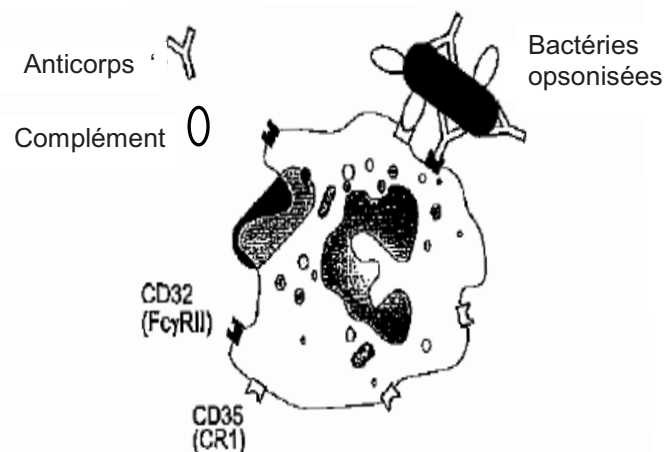


Figure 4 : Opsonisation des bactéries par des antigènes et les molécules du complément. (*Tizard 1996*)

iii. Reconnaissance non immunologique

Ce type de reconnaissance dépend des lectines et des propriétés hydrophobes des surfaces cellulaires. Ainsi les récepteurs lectines-carbohydrates de la surface

cellulaire du neutrophile bovin peuvent interagir avec les pilis riches en carbohydrates d'*E. coli* par exemple, en l'absence d'opsonines spécifiques (Paape 1996).

Encadré : l'importance des protéines membranaires

Les L-sélectines

Les L-sélectines sont cruciales dans les mécanismes de défense faisant intervenir les neutrophiles. En effet, ce sont elles qui sont responsables de la première adhésion entre les GNN et l'endothélium vasculaire. Elles permettent donc le ralentissement et la capture des GNN vers le site de l'infection.

Le complexe CD11b/CD18

Nous avons vu précédemment que le CD11b/CD18 (ou CR3) avait un rôle primordial dans la réponse à une infection. En effet, il permet l'adhésion ferme à l'endothélium vasculaire en regard duquel se situe l'infection (liaison aux molécules ICAM-1).

Par ailleurs, il permet la reconnaissance des bactéries opsonisées par le fragment C3b du complément, ce qui initie le processus de phagocytose, et permet donc l'élimination de la bactérie.

Son importance est aussi avérée par le fait que chez des sujets déficients en CD18 et atteints de déficit d'adhésion leucocytaire, (ou Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency ou BLAD chez les bovins), la capacité d'adhésion des leucocytes est fortement diminuée. De la même manière, la capacité de phagocytose, qui fait intervenir CR3, et donc indirectement CD11/CD18, est également diminuée.

c. La phagocytose

Une fois que le neutrophile a reconnu l'agent pathogène, il doit le phagocyter afin de l'éliminer. L'ingestion se fait à partir d'une invagination de la membrane, couplée à une extension de celle-ci sous la forme d'un pseudopode. L'extension de pseudopodes nécessite la participation du cytosquelette d'actine. Le rôle de l'actine a été mis en évidence dans la phagocytose par l'effet inhibiteur de la cytochalasine B,

un inhibiteur de la polymérisation de l'actine. La polymérisation de l'actine est observée en quelques secondes suite à l'engagement des récepteurs Fc ; sa dépolymérisation se fait après quelques minutes (*Greenberg 1991, Diakonova 2002*).

La fusion des pseudopodes conduit à la formation d'une vacuole (**phagosome**) dans laquelle le pathogène se trouve piégé. Ainsi, la particule ingérée se trouve en présence d'une quantité minimale de fluide extracellulaire.

Les granules cytoplasmiques du neutrophile fusionnent alors avec la membrane du phagosome et y déversent leur contenu bactéricide donnant naissance au **phagolysosome**. Le faible volume du phagosome permet aux molécules bactéricides d'agir directement sur la bactérie sans être diluées.

- Les granulations des granulocytes neutrophiles

Les GNN bovins possèdent 3 types de granules qui apparaissent successivement au cours de la granulopoïèse :

- Les **granules azurophiles ou primaires** sont les premiers à être produits. Ils sont dits peroxydase positifs. Ils contiennent la myéloperoxydase, une enzyme permettant la formation d'un produit hautement bactéricide à partir de peroxyde d'hydrogène et d'ions halogène. Le lysozyme, présent en grande quantité dans les granules primaires des autres espèces, est présent à faible concentration dans les granules azurophiles des cellules bovines.

Ils contiennent aussi trois protéases : la cathepsine, l'élastase, et la protéase 3. Lorsque le phagosome est formé (internalisation de la bactérie dans une vacuole) les granules primaires fusionnent et libèrent leurs enzymes formant alors un phagolysosome.

- Les granules secondaires ou spécifiques sont dits peroxydase négatifs. Ils contiennent des sous unités de la NADPH oxydase (cytochrome b558,...) et des protéines bactéricides. Les deux tiers du lysozyme total sont contenus dans ces granules. La lactoferrine (qui fixe le fer indispensable à la croissance des bactéries G-) est présente dans ces granules (*Segal 2005*)

- Un troisième type de granules dépourvus de peroxydase a été identifié en grande quantité chez les bovins. Ces granules contiennent la majorité des protéines antimicrobiennes, telle la lactoferrine ou les bacténécines (Bac5, Bac7). Les

bacténécines sont des polypeptides hautement cationiques qui perméabilisent la membrane interne et externe d'*E. coli*. Ces granules nouveaux contiennent aussi les β -defensines, qui ont une activité bactéricide (contre G-, G+, les champignons et certains virus) indépendamment de l'oxygène.

Les composés bactéricides des granules les plus importants sont décrits ci-dessus et sur la Figure 5. Ils contiennent aussi des molécules telles que l'élastase ou la collagénase, qui facilitent la migration du granulocyte à travers les tissus, ainsi que différents récepteurs, des protéines du complément. Des sous-unités de la NADPH oxydase sont stockées dans tous les types de granules. La dégranulation permet l'assemblage de l'enzyme et le déclenchement de l'explosion oxydative.

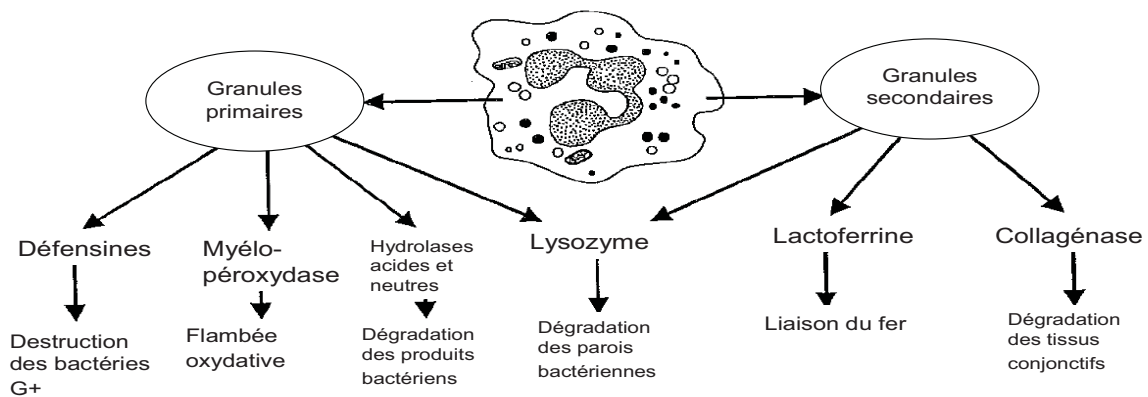


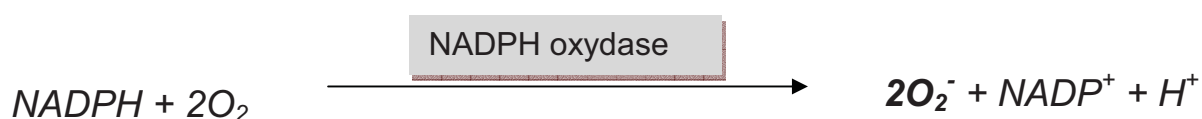
Figure 5 : Les principaux composants des granules cytoplasmiques des neutrophiles et leurs fonctions (d'après Tizard 1996)

L'activation du GNN déclenche un processus associé à une consommation d'oxygène appelé « *explosion respiratoire* » et génère des formes réactives de l'oxygène, tels que le radical anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH°) et le singulet d'oxygène (1O_2). Le système enzymatique impliqué dans la production de ces formes réactives de l'oxygène (**FRO**) est un système multimoléculaire complexe appelé NADPH Oxydase.

d. Le système de production des formes réactives de l'oxygène

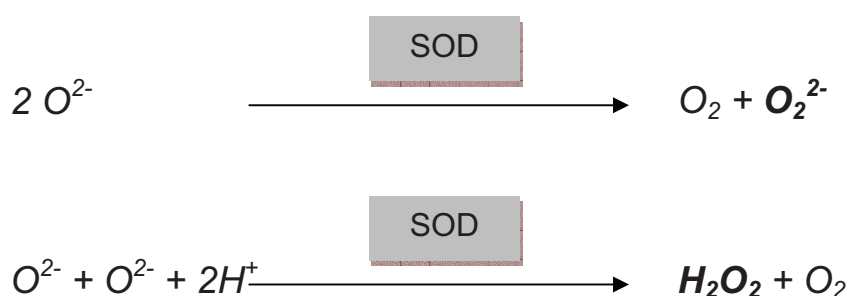
Une fois le GNN activé, la bactérie phagocytée et la dégranulation dans le phagolysosome effectuée, le système enzymatique de la NADPH oxydase responsable de la production des formes réactives de l'oxygène se met en place.

L'oxygène consommé par les GNN est converti en ion superoxyde (O_2^-) par une réduction monovalente en utilisant le NADPH cellulaire comme donneur d'électrons. Cette réaction est catalysée par la NADPH oxydase.



L'ion superoxyde est un oxydant moyen et son pouvoir bactéricide est très faible ; c'est essentiellement un précurseur de formes oxydantes fortement réactives.

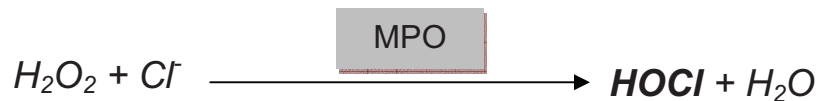
Les radicaux O_2^- sont transformés en O_2^{2-} , puis en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par dismutation spontanée (pH acide) ou enzymatique (superoxyde dismutase (**SOD**)) et transfert d'un électron.



Le peroxyde d'hydrogène est reconnu comme agent oxydant bactéricide. Il réagit avec de nombreux composés tels que les thiols, les ions fer et cuivre, des protéines de l'hème. Sa perméabilité membranaire est bonne, cependant son action est lente et de grandes quantités doivent être produites pour être bactéricide.

L'interaction H_2O_2/O_2^- peut, en présence d'un métal de transition, donner naissance au radical hydroxyle OH^\bullet hautement toxique qui réagit rapidement avec les molécules environnantes. Il génère des cassures de l'ADN, inactive certaines enzymes, induit la peroxydation lipidique et génère des radicaux secondaires. Il est très réactif avec la plupart des molécules biologiques, mais sa portée d'action est faible (*Hampton 1998*).

Par ailleurs, la myéloperoxydase (**MPO**) libérée dans le phagolysosome catalyse la transformation de H_2O_2 , en présence d'un halogène tel que Cl^- , en acide hypochloreux, qui est fortement bactéricide :

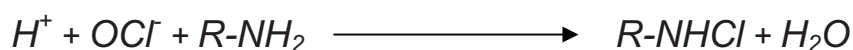


L'acide hypochloreux est l'un des oxydants les plus puissants qui sont produits lors de cette cascade de réactions. Il réagit avec un grand nombre de composés biologiques et a une bonne perméabilité membranaire. Ainsi la MPO est une enzyme clé du système bactéricide des GNN.

D'autres réactions entre l'hypochlorate et le peroxyde d'hydrogène aboutissent à la formation d'oxydants de type singulet de l'oxygène : 1O_2 .

Le singulet d'oxygène est produit en grande quantité par les GNN. Son activité bactéricide n'est plus à prouver (*Stief 2003*) et il présente une toxicité tissulaire moindre par rapport aux autres FRO. C'est donc avec l'acide hypochloreux un élément essentiel de cette cascade de réactions.

Une grande partie de l'acide hypochloreux est convertie en chloramine qui est également bactéricide :



Les chloramines sont des oxydants moyens à longue durée de vie. Ils réagissent essentiellement avec les thiols, les thioesters et les composés ferreux, et ferriques. (*Hampton 1998 ; Stief 2003*)

La production des FRO se fait sur la face externe de la membrane plasmique. Celle-ci devient la face interne de la membrane du phagosome lors des processus de phagocytose des micro-organismes. Ainsi, les FRO sont produits à l'intérieur du phagolysosome et l'agent pathogène phagocyté baigne alors dans une mixture létale d'agents oxydants.

Cependant, si elles sont produites de façon excessive ou inappropriée dans le milieu extracellulaire, les FRO peuvent participer à la création de lésions tissulaires au sein du site inflammatoire. En effet, les lésions biochimiques créées par les FRO sont multiples : peroxydations lipidiques (aboutissant à une désorganisation membranaire), atteinte protéique (avec fragmentation, agrégation, oxydation des groupements sulfhydryles), atteinte des acides nucléiques (avec cassure et mutation de l'ADN).

La NADPH oxydase active est formée après stimulation du GNN par le regroupement au niveau membranaire et sous-membranaire de plusieurs molécules. Une partie de ces molécules est membranaire (entre autres le cytochrome b558 et une petite protéine G de type Rap1A. ; le cytochrome b558 est composé d'une sous-unité α (p22phox) et d'une sous-unité β (gp91phox)).

L'autre partie des molécules formant la NADPH oxydase se trouve à l'état inactif dans le cytosol (p47phox, p67phox et p40phox associés à un complexe protéique).

Les changements conformationnels induits principalement par les phosphorylations des composants de l'oxydase permettent de nouvelles liaisons protéine-protéine, et conduisent à l'assemblage et à l'activation de la NADPH oxydase (Figure 6). C'est ce regroupement qui déclenche le transfert d'électrons à partir du NADPH sur la flavine, puis sur les groupements hémiques du cytochrome b et enfin sur l'oxygène moléculaire donnant naissance à l'anion superoxyde O_2^- (Babior 1999 ; Nauseef 2004).

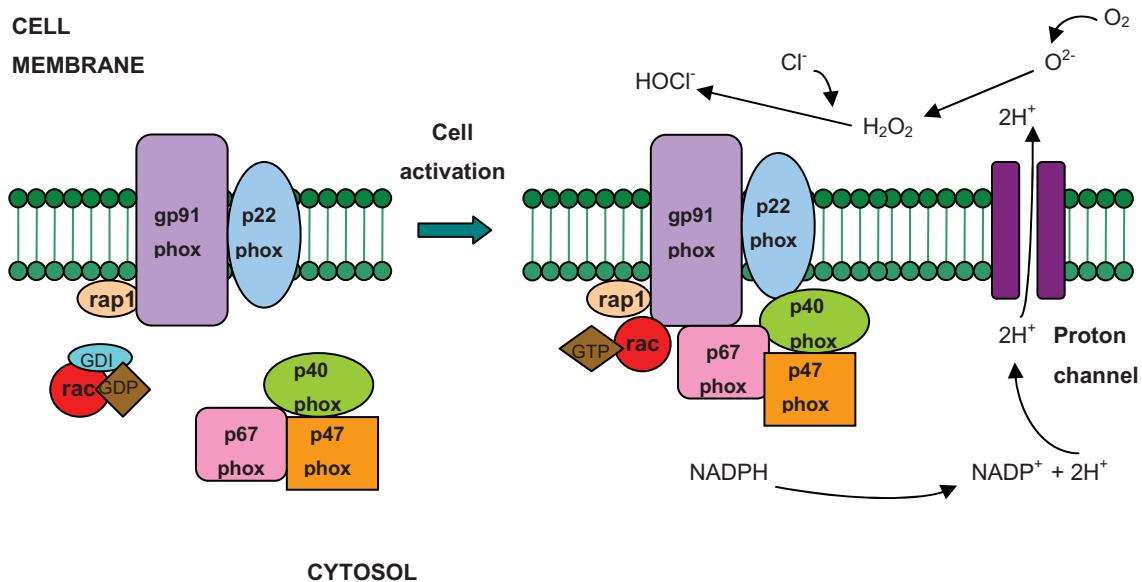


Figure 6 : Activation de la NADPH oxydase (d'après Assari 2006)

◇ **Encadré : le GNN dans le lait**

Dans la glande mammaire saine, et normalement stérile, il réside un certain nombre de GNN. Les numérations de cellules somatiques physiologiques dans le lait sont de l'ordre de 50.000 cellules/ml de lait, dont 5 à 20% sont des GNN (Rainard 2003). Ils ont un rôle de surveillance et forment une barrière de défense immunitaire. Celle-ci est efficace pour la destruction précoce d'un faible nombre de bactéries infectantes. Cependant, si les agents infectieux parviennent à pénétrer la glande mammaire et à s'y développer, alors la barrière neutrophilique est insuffisante. En cas d'infection mammaire, un recrutement important de GNN du sang se produit, et la population cellulaire du lait augmente d'un facteur 5 à 10, et 80% des cellules sont des GNN (Rainard 2003). La capacité des cellules mobilisées à phagocyter les germes présents est primordiale pour une réponse efficace. Or les GNN du lait se sont avérés moins efficaces que les GNN du sang (Mehrzaad 2001). En effet, en raison des facteurs précisés ci-dessous, leur capacité de phagocytose est réduite.

Les GNN du lait contiennent 38% de glycogène en moins comparé aux GNN du sang (Newbould 1973), donc moins d'énergie pour la phagocytose. De plus, le lait est pauvre en oxygène nécessaire à la formation des formes réactives de l'oxygène.

Les GNN du lait ingèrent des globules gras, ce qui a pour effet de modifier la morphologie et les granulations de la cellule, ayant pour conséquence une capacité de phagocytose encore diminuée (Paape 2002).

En outre, il a été montré que la caséine interfère avec les voies de formation des FRO (Cooray 1996)

L'afflux des cellules phagocytaires et la réaction inflammatoire en réponse à l'infection sont des mécanismes de défense essentiels pour éliminer les microorganismes. Les neutrophiles sont un élément clef de cette réponse : ils sont attirés précocement par des facteurs chimiotactiques et atteignent le lieu de l'infection par diapédèse en traversant la paroi des capillaires dont la perméabilité est accrue. Ils phagocytent les microorganismes dans le phagosome qui fusionne avec les granules lysosomiaux pour former le phagolysosome, à l'intérieur duquel les particules infectieuses sont digérées. Cette activation des neutrophiles permet la digestion bactérienne par une activation de la consommation d'oxygène (l'explosion respiratoire ou *respiratory burst*) et une dégranulation, indépendante de l'oxygène. La dégranulation libère des protéines cationiques, la lactoferrine et des enzymes hydrolytiques et protéolytiques, tandis que l'explosion respiratoire implique le fonctionnement de la NADPH oxydase et de la myéloperoxydase, agissant de concert pour éliminer les microorganismes en produisant des espèces oxydantes. Malheureusement, ces voies de défense de l'organisme ne sont pas toujours suffisantes pour protéger l'organisme vis-à-vis des infections bactériennes. Les capacités de neutrophiles peuvent en effet être dépassées, et l'infection s'installe. D'autre part, ce sont parfois les fonctions de défense du neutrophile qui sont affectées.

3. Facteurs de variation de l'activité neutrophilique

Le stade physiologique des animaux influe sur l'activité des neutrophiles. Il a été montré que la capacité de diapédèse spontanée, l'iodination, et la chimioluminescence des neutrophiles est très diminuée dans les premières semaines après la mise bas (*Kehrli 1989, Mehrzad 2001*). De même, l'expression des L-sélectines à la surface des neutrophiles est plus faible, et reste à des niveaux d'expression bas durant les jours suivant la parturition (*Lee and Kehrli 1998, Monfardini 2002*).

Des molécules administrées aux animaux sont aussi à l'origine de variations. Par exemple, l'administration de corticoïdes est à l'origine d'une neutrophilie. Cette neutrophilie s'expliquerait par une mobilisation du pool des cellules marginées et une

diminution de l'adhésivité des cellules aux capillaires. Cette diminution d'adhésivité est à l'origine d'une diminution de la diapédèse. Par ailleurs, les corticoïdes peuvent légèrement diminuer la bactéricidie, mais ne modifient pas la phagocytose.

En médecine humaine, différentes études portent sur l'activité des neutrophiles de patients atteints d'insuffisance rénale. En effet, lors de maladies rénales à un stade avancé, les patients sont plus sensibles aux infections. L'étude de l'immunodéficience de ces personnes repose essentiellement sur l'étude de l'activité des neutrophiles et sur les effets de l'urémie.

La glycolyse des neutrophiles chez les individus urémiques semble être perturbée, ce qui diminue l'énergie disponible pour les fonctions de destruction des bactéries (*Vanholder 1991*). Par ailleurs, il a aussi été observé une diminution de la production de radicaux libres et de la libération de myéloperoxydase chez ces patients (*Vanholder 1993*).

L'apoptose des neutrophiles semble aussi être augmentée chez des patients urémiques (*Cendoroglo 1999, Sardenberg et al. 2006*), ce qui est en accord avec les résultats de *Perinayagam et al. (2000)* qui ont montré que les taux de sFas sont supérieurs dans le sérum de patients atteints d'insuffisance rénale. Le rôle de l'urée et de toxines présentes dans le sérum des patients est suspecté. *Jaber et al. (2001)* ont montré l'implication des protéines Fas dans l'apoptose des neutrophiles exposés à l'urée. En effet, les neutrophiles portent sur leur membrane des protéines Fas qui interagissent avec Fas Ligand (**Fas-L**) sécrété par les cellules polynucléaires. Ces protéines agissent de manière autocrine ou paracrine, et sont à l'origine du processus de mort cellulaire programmée. Ils ont montré que l'expression de Fas est augmentée chez les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique et que le sérum urémique augmente l'expression des protéines Fas et Fas-L.

Une étude réalisée par *Murata et Horino (1998)* met aussi en évidence le rôle néfaste d'une exposition à des doses élevées d'ammoniac atmosphérique. En effet, il a été montré que l'ammoniac augmente la chimioluminescence, diminue la taille des populations de neutrophiles (par effets cytolytiques probables) et inhibe les fonctions des neutrophiles (chémotactisme, phagocytose, dégranulation, bactéricidie).

Les troubles infectieux qui sont rapportés lors de transitions alimentaires (pathologies mammaires, utérines...) méritent donc d'être étudiés sur la base des fonctions

neutrophiliques. En effet, lors de la mise à l'herbe, les taux d'azote soluble augmentent brusquement, ce qui pourrait avoir un effet néfaste sur les capacités de défense des cellules immunitaires.

La partie suivante s'intéresse donc à détailler le métabolisme de l'azote chez les ruminants pour comprendre comment un changement de ration peut être à l'origine d'une exposition des cellules à des métabolites tels que l'urée et l'ammoniac.

B. Métabolisme de l'azote chez les bovins

Le tube digestif des ruminants se caractérise par la présence de pré-estomacs (rumen, réseau, feuillet) et d'un estomac glandulaire, la caillette, où est sécrété le suc gastrique.

Le rumen, le plus volumineux de tous (50 à 60% du volume total du tube digestif), est le siège de la digestion microbienne, grâce à une relation symbiotique établie entre le ruminant et la microflore.

1. Digestion de l'azote, système PDI (Protéines Digestibles dans l'Intestin)

a. Le milieu ruminal

La microflore ruminale est constituée majoritairement par les bactéries qui représentent près de 50% de la biomasse microbienne (8.10^9 à 4.10^{10} par ml de liquide ruminal).

La majorité d'entre elles (70%), de type anaérobie, est fixée aux particules alimentaires et assure leur dégradation. D'autres bactéries sont présentes sous forme libre dans le jus ruminal et une petite fraction de bactéries micro-aérophiles se trouve en périphérie contre la paroi ruminale.

La composition de cette population bactérienne est complexe et l'on compte plus de 200 espèces de bactéries ; on les regroupe classiquement en deux catégories : les bactéries cellulolytiques, dégradant les glucides pariétaux, et les bactéries amylolytiques dégradant l'amidon.

Les principales espèces cellulolytiques sont : *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* (Eugene 2002).

Les bactéries cellulolytiques sont incapables de dégrader l'azote alimentaire en ammoniac, composé nécessaire à la synthèse de leurs protéines. Ce sont des bactéries protéolytiques (30 à 50% des bactéries du rumen) qui assurent cette dégradation (dégradation des protéines par *Bacteroides ruminicola*, et des peptides par *B. ruminicola*, *B. fibrisolvens*, *S. bovis*). L'ammoniac ainsi produit servira de

substrat aux autres bactéries. Cet exemple reflète le caractère complexe des interactions entre les espèces microbiennes du rumen.

Mille fois moins nombreux que les bactéries, mais plus volumineux, les protozoaires représentent la même biomasse que les bactéries. Deux groupes principaux se distinguent au sein des protozoaires : les ciliés et les flagellés.

Les ciliés sont les plus nombreux : on en compte entre 10^5 et 10^8 par ml de liquide ruminal. Ils ingèrent les bactéries, participant de ce fait à l'équilibre de la population bactérienne, et ont la capacité de dégrader les acides aminés (activité trois fois supérieure à celle des bactéries). (*Paccard 1992*)

Des champignons anaérobies stricts sont également présents, et représentent environ 10% de la biomasse du rumen (10^3 à 10^5 par ml) (*Fonty 1991*) ; ils sont fixés sur les particules végétales et dégradent la cellulose et les hémicelluloses. (*Jean-Blain 2002, Drogoul 2004*)

L'équilibre de la flore ruminale est nécessaire à la bonne valorisation des aliments ingérés. Des dysmicrobismes peuvent être observés à la suite de changements brutaux d'alimentation (lors d'acidose par exemple), modifiant ainsi les paramètres physico-chimiques et les profils microbiens du rumen.

Les conditions idéales de développement des micro-organismes du rumen sont :

- une température constante de 39-40°C
- un pH compris entre 6,5 et 7,2
- une teneur en eau comprise entre 85 et 90%
- un potentiel d'oxydoréduction variant de -150 à -250 mV (*Bonnefont 2008*)

b. Digestion microbienne de l'azote alimentaire

L'azote contenu dans les fourrages ingérés par les ruminants est présent sous deux formes :

- Une partie de la matière azotée totale (**MAT**) est contenue dans les protéines qui devront être hydrolysées par les bactéries du rumen.
- Une autre partie, l'azote non protéique (**ANP**), pourra être transformé directement en ammoniac par les bactéries.

Les ruminants peuvent ainsi tirer profit des deux formes d'azote disponibles.

Une fois ingérées, les matières azotées de la ration sont dégradées par les bactéries protéolytiques du rumen. Cependant, une partie des protéines (protéines insolubles et quelques protéines solubles) ne subit pas de dégradation et transite directement vers l'intestin grêle, constituant la **matière azotée non dégradable (MANonDég)** appelée aussi Protéines Intestinales d'origine Alimentaire (**PIA**) dans le système PDI.

La dégradation des protéines se fait en plusieurs étapes.

La paroi des bactéries joue un rôle primordial dans la première étape de la dégradation des protéines : les protéases et les peptidases hydrolysent ces dernières en polypeptides, puis en oligopeptides (*Nugent 1981*). Les protozoaires interviennent peu dans cette étape : ils ingèrent les particules protéiques et les bactéries (*Coleman 1975, Ushida 1986*).

Les oligopeptides ainsi formés sont hydrolysés en acides aminés au sein de la cellule. Ces derniers sont ensuite désaminés, libérant ainsi des acides gras volatils et de l'ammoniac (*Mackie 1990*). La contribution des protozoaires dans cette dernière étape est primordiale, leur activité de désamination étant trois fois supérieure à celle des bactéries (*Hino 1985*). (Figure 7)

Ainsi par l'action conjointe des micro-organismes du rumen, la matière azotée ingérée est catabolisée afin de fournir des acides gras volatils (**AGV**) et de l'ammoniac (**NH₃**). Une partie de l'ammoniac est résorbé par la muqueuse ruminale : il parvient alors jusqu'au foie où il est transformé en urée.

Les AGV et le NH₃ restant sont utilisés par la flore ruminale pour sa propre synthèse protéique, tant que les apports énergétiques sont suffisants (apport de matière organique fermentescible ou **MOF**). La croissance microbienne est optimale avec des concentrations en azote ammoniacal au moins égales à 110 – 160 mg/l (*Hume 1970*). Les protéines contenues dans les corps bactériens et les protozoaires constituent la matière azotée d'origine microbienne (**MAM**). Environ 20% de cette matière azotée est perdue sous forme de bases azotées. Les 80% restants, sous forme protéique, transitent vers l'intestin et constituent les protéines intestinales d'origine microbienne (**PIM**). (Figure 8).

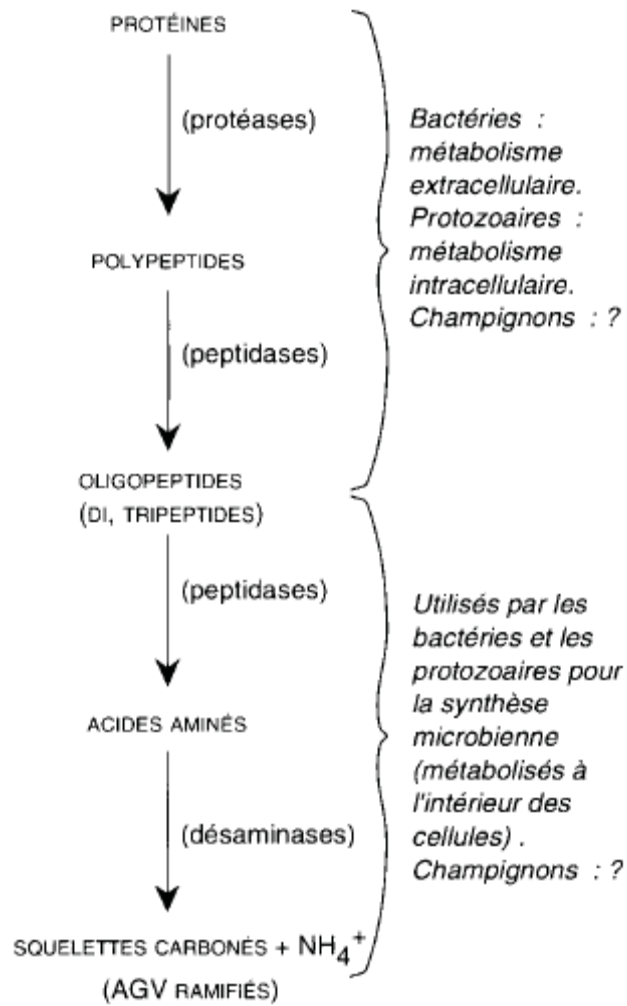


Figure 7 : Dégradation des composés azotés dans le rumen (Jouany, 1994)

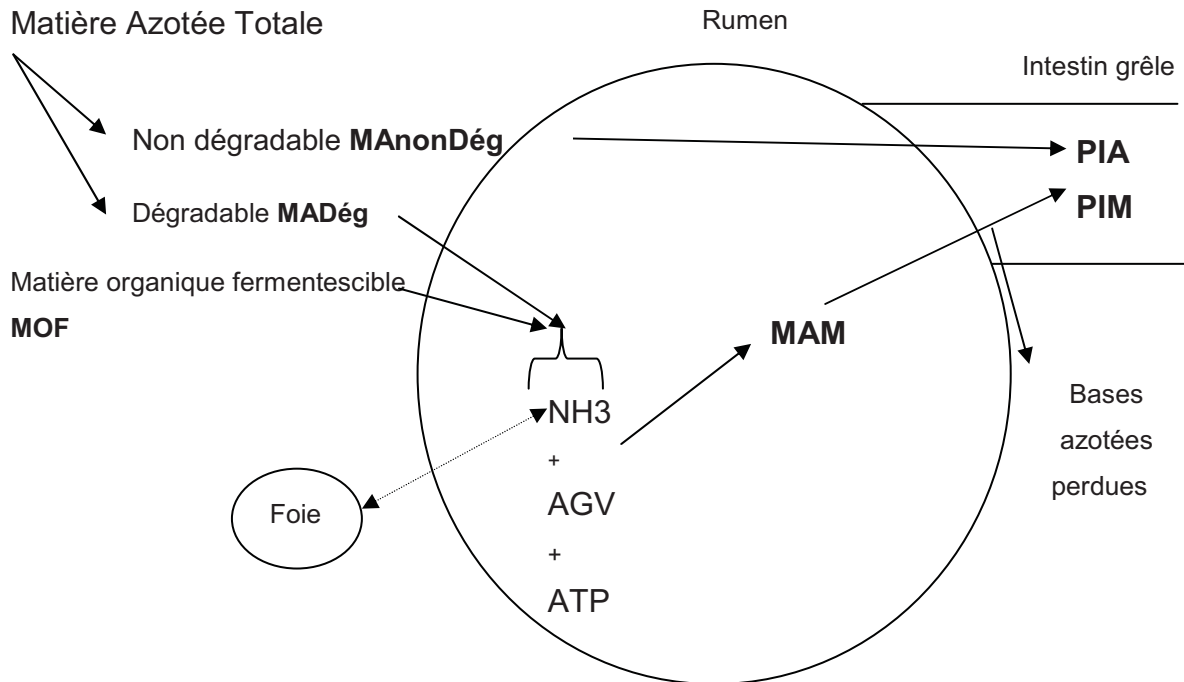


Figure 8 : Schéma simplifié du devenir des matières azotées dans le rumen, (d'après *Enjalbert 2006*)

c. Le système PDI

Deux types de matière azotée arrivent donc dans l'intestin, lieu de l'absorption des nutriments : d'une part les protéines non dégradées dans le rumen (**PIA**), et d'autre part, les protéines issues de la protéosynthèse microbienne (**PIM**).

Le système PDI proposé par l'INRA en 1978, permet d'évaluer les apports alimentaires pour les ruminants en quantifiant le métabolisme des matières azotées d'origine microbienne.

Des valeurs PDI sont déterminées pour chaque aliment en prenant en compte quatre caractéristiques :

- la teneur en matière azotée totale
- la dégradabilité théorique (**DT**)
- la teneur en matière organique fermentescible
- la digestibilité réelle des acides aminés d'origine alimentaire (**dr**)

i. Valeur PDIA

La valeur PDIA représente les protéines réellement digérées dans l'intestin d'origine alimentaire. Il s'agit de la part de protéines intestinales d'origine alimentaire (PIA) qui est absorbée dans l'intestin.

La valeur PDIA de l'aliment peut être calculée suivant la formule :

$$\text{PDIA} = 1,11 \times \text{MAT} \times (1 - \text{DT}) \times \text{dr}$$

ii. Valeur PDIM

La valeur PIM correspond à la fraction de protéines issues de la protéosynthèse microbienne qui sont présentes dans l'intestin grêle. Cependant, la digestibilité n'étant pas totale, seule une partie de celles-ci est absorbée par la muqueuse intestinale. Ainsi est définie la valeur **PDIM** qui représente les protéines réellement digérées dans l'intestin et d'origine microbienne ($\text{PDIM} = \text{PIM} \times \text{dr}$ avec $\text{dr} \approx 80\%$ pour les PIM)

Par ailleurs la protéosynthèse microbienne est dépendante de deux facteurs principaux :

- l'énergie fermentescible (par fermentation de la MOF)
- la quantité d'azote dégradable disponible

On peut donc distinguer en théorie deux valeurs PDIM :

La valeur **PDIME**, qui représente la quantité de protéines réellement digérées dans l'intestin d'origine microbienne permise par l'énergie, c'est-à-dire dans le cas où l'azote n'est pas limitant. Cette valeur est calculée à partir de la quantité de matière organique fermentescible.

La valeur **PDIMN**, qui représente la quantité de protéines réellement digérées dans l'intestin d'origine microbienne permise par l'azote, c'est-à-dire dans le cas où l'énergie n'est pas limitante. Elle est dépendante de la quantité de NH_3 présente dans le rumen, et donc de la quantité de matière azotée dégradable dans le rumen.

Ainsi pour un aliment distribué seul, la valeur PDIM sera la plus petite des deux valeurs définies ci-dessus (Enjalbert, 2006) (Figure 9) :

$$\text{PDIM} = \min(\text{PDIME}, \text{PDIMN})$$

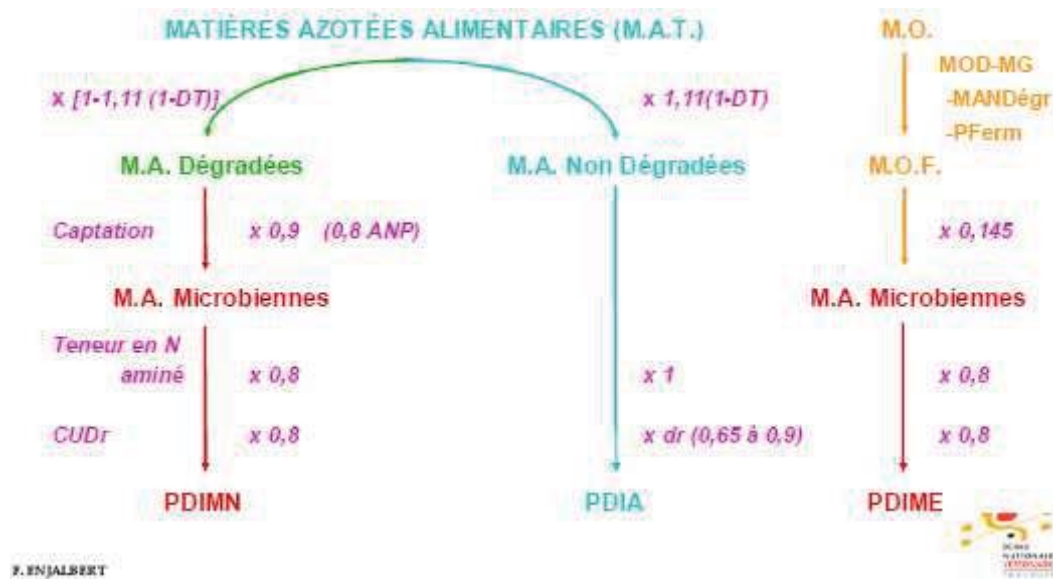


Figure 9 : Schéma récapitulatif du calcul des valeurs PDIA, PDIMN, et PDIME d'un aliment (Enjalbert, 2006)

L'équilibre entre les apports énergétiques et azotés peut être obtenu pour un aliment si celui-ci contient 160 g de matière azotée dégradable par kg de matière organique fermentescible.

Dans le cas d'un aliment mal équilibré en azote et en énergie, le facteur en excès sera mal valorisé. (Figure 10)

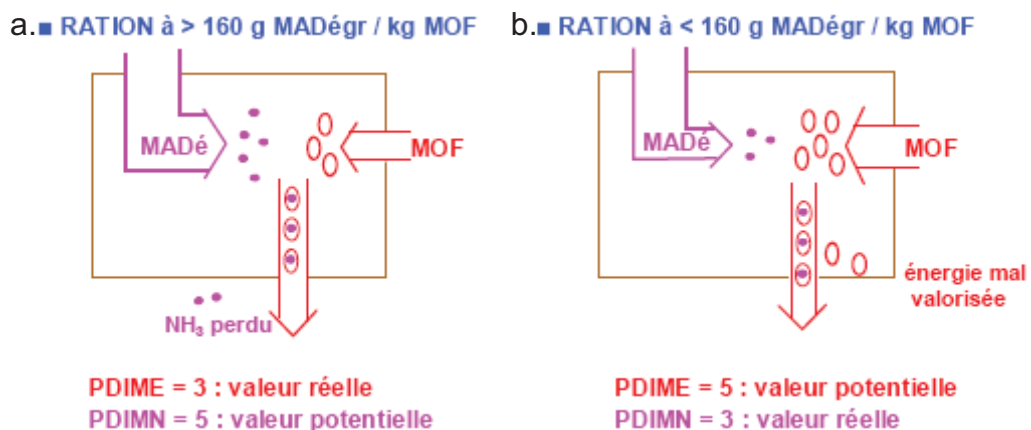


Figure 10 : Notion de PDIME et PDIMN. a. matière azotée dégradable en excès. b. matière organique fermentescible en excès (Enjalbert 2006)

Grâce à la définition de ces deux valeurs, on peut caractériser un aliment par deux valeurs évaluant les protéines réellement digérées dans l'intestin :

- les protéines réellement digérées dans l'intestin permises par l'azote (**PDIN**) :

$$PDIN = PDIA + PDIMN$$

- les protéines réellement digérées dans l'intestin permises par l'énergie (**PDIE**) :

$$PDIE = PDIA + PDIME$$

d. Equilibre PDI des rations

Les calculs des valeurs PDI présentés ci-dessus s'appliquent pour un aliment pris isolément. Ainsi, la plus petite des deux valeurs (PDIE / PDIN) est la valeur réelle de l'aliment (valeur PDI), l'autre valeur pouvant être qualifiée de valeur potentielle, ou valeur maximale. Celle-ci peut être atteinte lors d'association avec des aliments dont le facteur limitant est différent.

Ainsi pour calculer l'apport PDI d'une ration il faut calculer séparément la somme des apports PDIE et la somme des apports PDIN des aliments, et retenir la plus faible valeur des deux.

L'association raisonnée des aliments permet ainsi par supplémentation de valoriser au mieux les apports, de façon à se rapprocher au maximum de l'équilibre :

$$\text{Somme des apports PDIN} = \text{somme des apports PDIE} = \text{besoin PDI}$$

En effet, les aliments ne contiennent pas tous le même équilibre PDIE / PDIN.

Ainsi, on peut distinguer :

- des aliments dont la **valeur PDIE > PDIN** : il s'agit des céréales, de l'ensilage de maïs, de certains fourrages de mauvaise qualité. Les matières azotées dégradables sont donc le facteur limitant de la protéosynthèse. En outre, ces aliments ont un taux azoté faible (MAT < 12% de matière sèche)

- des aliments dont la **valeur PDIN > PDIE** : il s'agit de fourrages jeunes ou à base de légumineuses, des oléo-protéagineux et des tourteaux. L'énergie fermentescible est

alors le facteur limitant de la protéosynthèse ; le taux azoté de ces aliment est élevé (MAT > 14% de matière sèche)

- l'urée est un cas particulier : en effet, elle n'apporte pas d'énergie ; elle ne possède donc qu'une valeur PDIN potentielle qui sera valorisée seulement si elle est associée à une source d'énergie (Figure 11).

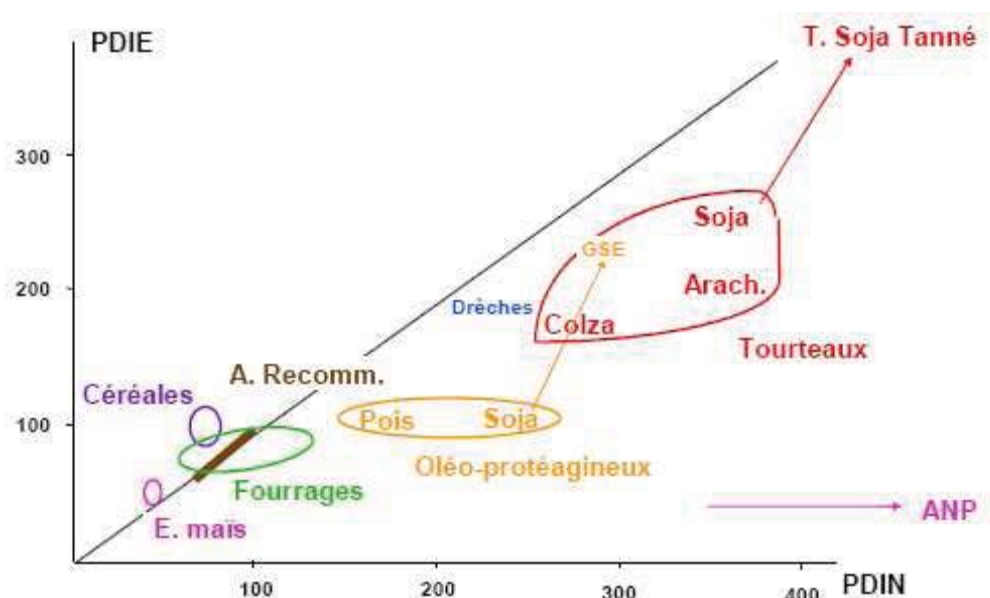


Figure 11 : Valeur PDI des principales matières premières (g/kg de matière sèche) (Enjalbert 2006)

L'étude de la composition des aliments et de leurs teneurs en PDIN et PDIE permet de composer des rations équilibrées en associant les aliments de manière raisonnée. On pourra ainsi associer un aliment dit « énergétique » tel que le maïs (apport PDIE > apport PDIN) avec un tourteau de soja dont l'apport PDIN > apport PDIE. (Tableau 3)

Tableau 3 : Apports PDIA, PDIE, PDIN de la luzerne déshydratée (protéines brutes : 17-18% sur MS), du tourteau de soja 48 (48% de protéines et MG sur brut), du maïs et de l'urée.

	Luzerne déshydratée	Tourteau de soja 48	Maïs	Urée
PDIA (g/kg MS)	58	202	52	0
PDIN (g/kg MS)	114	377	74	1143
PDIE (g/kg MS)	100	261	97	0

Ces matières premières sont classiquement utilisées en alimentation animale du fait de leur complémentarité ; dans notre étude, la ration distribuée aux animaux est d'ailleurs élaborée à partir de ces matières premières.

Ainsi, grâce à l'association des matières premières et à la connaissance des apports de chacune, le calcul de ration permet d'ajuster au mieux les quantités à apporter en fonction des besoins de l'animal.

Cependant 3 situations de déséquilibre peuvent être observées :

Valeur PDIE < Besoin PDI

Apport PDIN << Apport PDIE

Apport PDIN >> Besoin PDI

- Dans le cas d'un apport en PDIE inférieur au besoin en PDI, le défaut de couverture des besoins de l'animal se traduit par une baisse des performances.

- Lors d'un apport en PDIN inférieur à l'apport en PDIE, deux cas peuvent être distingués. Tout d'abord si la différence d'apports est faible, le recyclage de l'urée endogène par les glandes salivaires peut dans une certaine mesure compenser le déficit. Par contre, si l'apport PDIN et le recyclage de l'urée ne suffisent pas à couvrir le besoin PDI, les besoins de la flore et de l'animal ne seront pas couverts et les performances de l'animal seront donc affectées.

Le déficit tolérable, exprimé en grammes de (PDIE – PDIN) par unité fourragère (**UF**), est dépendant du type de production, de la situation physiologique de l'animal, et des caractéristiques de la ration.

On tolérera :

$$\frac{\text{Apport PDIE} - \text{Apport PDIN}}{\text{Apport UF}} \leq 4 \text{ à } 20$$

- Enfin, lors d'apport en PDIN supérieur au besoin en PDI, on distinguera 2 cas :

- l'apport PDIE est aussi supérieur au besoin en PDI :

On a alors une différence (apports PDIN – apports PDIE) faible. La flore synthétise des acides aminés en quantité supérieure au besoin de l'animal ; le NH₃ produit peut

être utilisé pour la protéosynthèse puisque l'apport en PDIE est suffisant. Les acides aminés produits en excès seront donc absorbés puis éliminés. Cependant cela conduit à une forte circulation d'urée dans l'organisme.

- l'apport en PDIE = besoin en PDI :

L'apport en PDIN de la ration est alors largement supérieur à l'apport PDIE. La dégradation des protéines dans le rumen conduit à une production élevée de NH₃ qui ne peut pas être utilisé par les bactéries car elles ne disposent pas de suffisamment d'énergie. Le NH₃ est alors absorbé par la paroi du rumen et circule dans l'organisme jusqu'au foie où il est détoxiqué en urée.

En cas d'excès aigu, les capacités de détoxification du foie sont saturées conduisant à un état d'alcalose.

En cas d'excès chronique, il semble que les performances des animaux (reproduction, résistance aux maladies) soient affectées.

Ainsi les calculs de ration reposent sur 3 règles d'équilibre :

- Apport PDIE \geq Besoin PDI
- $$\frac{\text{Apport PDIE} - \text{Apport PDIN}}{\text{Apport UF}} \leq 4 \text{ à } 20$$
- Apport PDIN – Apport PDIE < Tolérance

Le respect des deux premières règles est important car les performances de l'animal en dépendent directement, mais la dernière reste celle qui nous importe le plus car l'excès de PDIN peut entraîner des situations pathologiques d'intoxication à l'azote. De plus, lors d'excès azoté, des métabolites de l'azote sont produits, circulent dans l'organisme et sont possiblement à l'origine de la baisse d'immunité.

2. Les flux d'azote inorganique

a. Nature des métabolites et cycle de production

La digestion ruminale des protéines, ainsi que l'hydrolyse de l'azote non protéique, conduit à la formation d'azote inorganique sous forme de NH_3 dans le rumen.

Différentes formes d'azote non protéique sont utilisables en alimentation pour équilibrer les rations en apportant une source de PDIN sans apport de PDIE.

La plus généralement utilisée est l'urée mais d'autres molécules peuvent être utilisées, comme le phosphate d'urée, le biuret, le diurédo-isobutane et le sulfate d'ammonium. Ces derniers sont cependant moins riches en azote que l'urée (46% d'azote) et possèdent des vitesses de dégradation différentes. Ainsi, l'urée et le sulfate d'ammonium sont rapidement hydrolysés alors qu'à l'opposé, le biuret et le diurédo-isobutane sont lentement, voire très lentement hydrolysés (le phosphate d'urée a une vitesse de dégradation intermédiaire).

La première étape conduisant à la formation d'azote inorganique (NH_3) dans le rumen est donc la dégradation des matières azotées ingérées, conditionnée par la dégradabilité des aliments. L'hydrolyse de l'urée étant très rapide, le pic de production de NH_3 associé à l'urée sera plus précoce que le pic de production de NH_3 associé aux autres constituants de la ration (Figure 12).

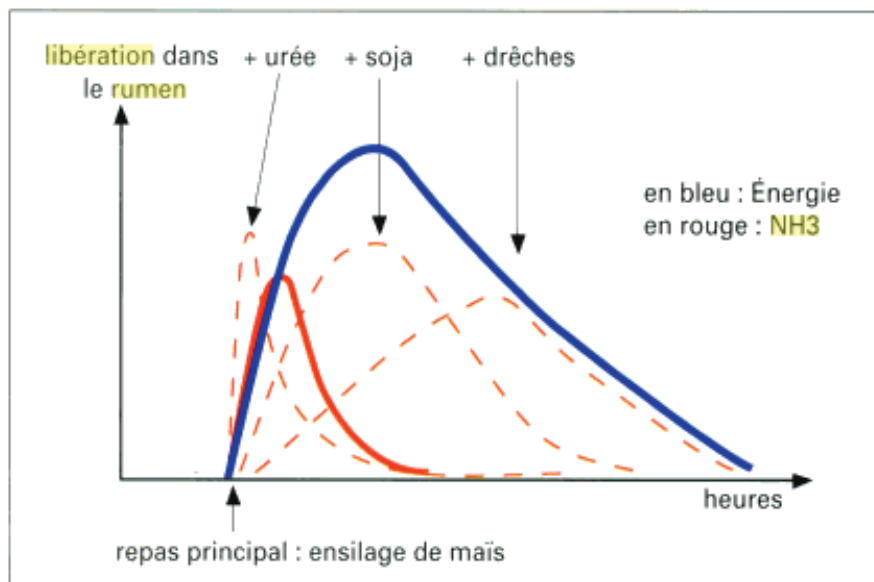


Figure 12 : Chronologie de la mise à disposition d'énergie et d'azote pour la microflore ruminale, cas de l'ensilage de maïs (Wolter, 1992)

Dans le rumen, une partie de l'ammoniac libéré est utilisée par la microflore, l'autre partie traverse la paroi du rumen et gagne le foie via la veine porte. La diffusion de l'ammoniac ($pK_a = 9,26$) n'est pas optimale au pH ruminal de 5,5-6 (à pH 6,4 1/1000 de l'azote ammoniacal est sous forme NH_3 contre 1/10 à pH 8,4) (Lloyd 1982). Cependant, l'absorption de l'ammoniac ruminal a tout de même lieu, et elle est d'autant plus forte que la concentration en ammoniac du rumen augmente (INRA 1988, Jean-Blain 2002). L'absorption d'ammoniac a lieu à des concentrations ruminales plus faibles que le seuil d'absorption communément admis qui est de 500 mg/l (Priymenko, 1998, Remond 1993).

L'ammoniac est drainé par la veine porte jusqu'au foie, où il est fortement capté. Il va ensuite être détoxiqué via plusieurs mécanismes dont deux principaux :

- la **synthèse d'urée**, prédominante, via le cycle de l'urée (Figure 13) ; 81 % de l'ammoniac est éliminé sous cette forme (Lapierre 2005, Horton 1994)
- le système glutamate déshydrogénase aminotransférase (**GDA**) (qui capte l'ammoniac pour former de la glutamine).

Le système Glutamate déshydrogénase localisé dans les mitochondries permet par amination réductrice de l' α -cétoglutarate de former du glutamate.



Les conditions *in vitro* semblent favoriser la formation de L-Glutamate. Cependant, *in vivo*, le sens de la réaction dépend probablement davantage du débit des différents substrats : dans les conditions les plus fréquentes, l'ammonium est rapidement épuré et les coenzymes sont principalement sous forme oxydée ; par conséquent, ces conditions favorisent la désamination du glutamate.

Le cycle de l'urée (= cycle de Krebs-Henseleit ou cycle de l'ornithine) permet cependant de récupérer l'ammoniac. En revanche, lorsque le cycle de l'urée commence à être dépassé, la concentration en ammoniac augmente et la réaction est entraînée vers la formation de L-Glutamate.

La capacité maximale d'extraction de l'ammoniac par le foie est de $1,84 \pm 0,25$ mmol/min/kg de foie (Symonds 1981).

Le cycle de l'urée est un cycle catalytique qui a lieu exclusivement dans le foie. Le cycle commence et se termine à l'ornithine. Il se déroule partiellement dans les mitochondries et le cytoplasme, ce qui est rendu possible par un échangeur de la membrane interne de la mitochondrie assurant l'échange de l'ornithine et de la citrulline. (Figure 13)

Ces différents mécanismes auraient une disposition spatiale qui leur confère une certaine complémentarité, avec la synthèse d'urée en zone périportale et la production de glutamine autour de la veine centro lobulaire par le système GDA (Figure 14). Ce dernier a une forte affinité pour l'ammoniac et agit comme un capteur final de l'ammoniac qui a échappé au système moins spécifique de synthèse de l'urée (Haussinger 1990).

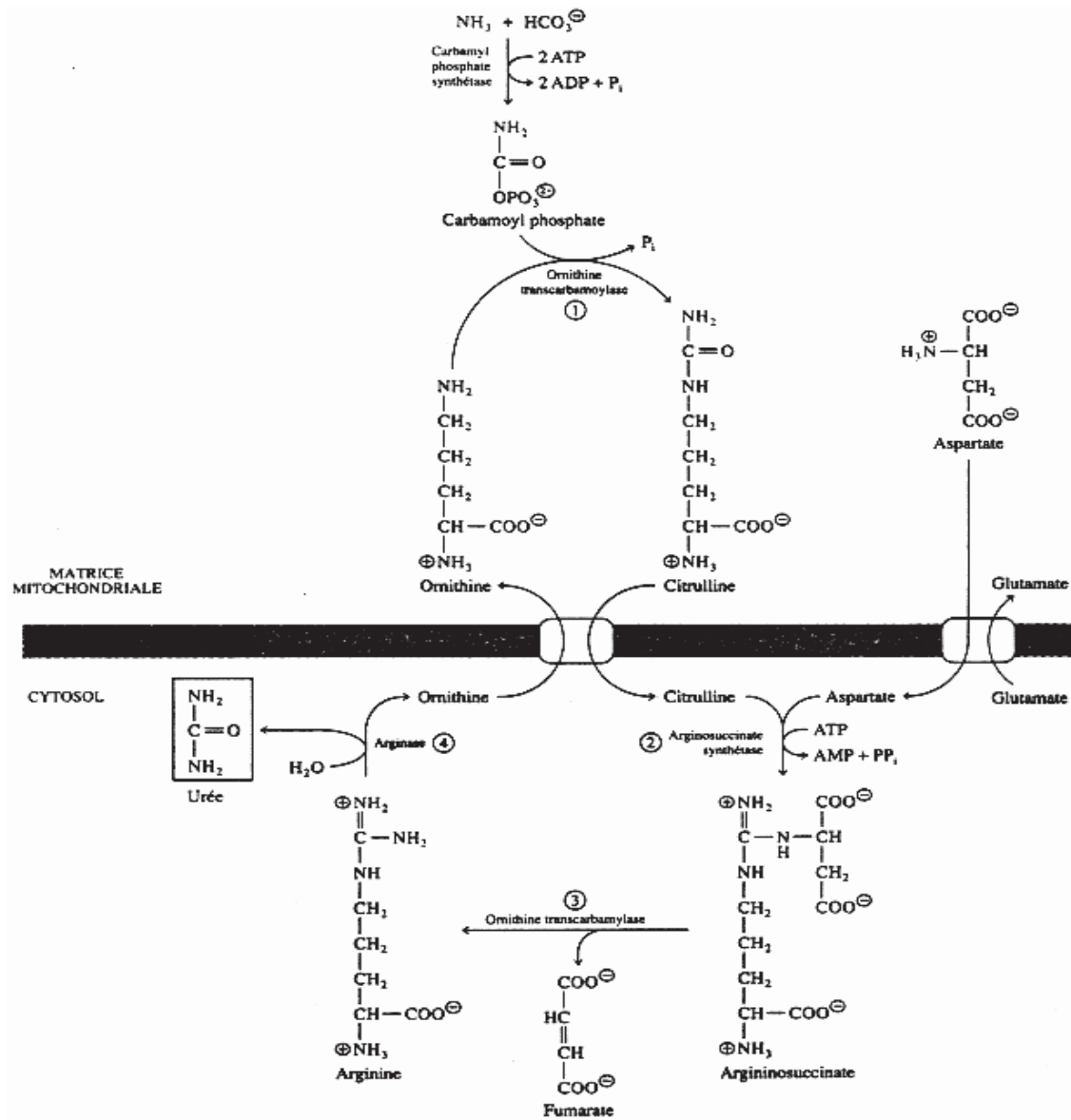


Figure 13 : Cycle de Krebs Henseleit (Horton 1994)

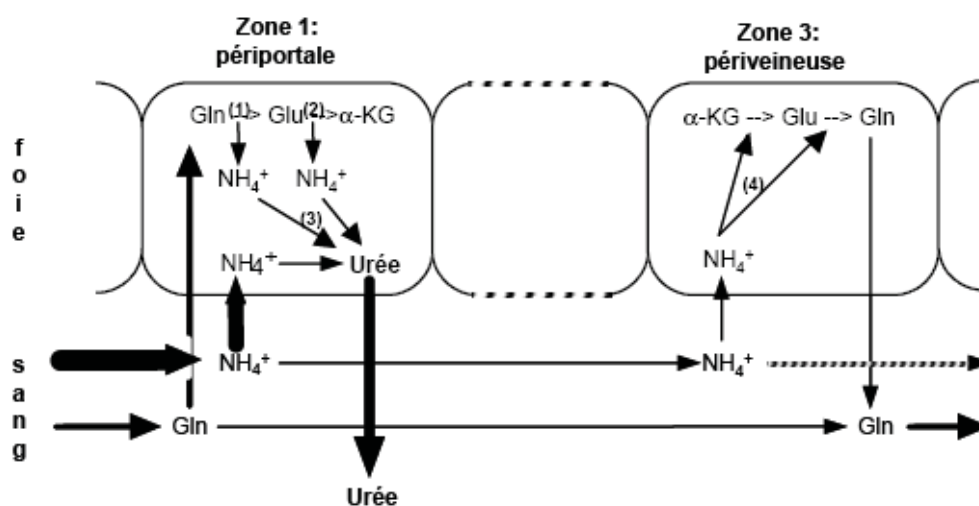


Figure 14 : complémentarité de la répartition des mécanismes d'élimination de l'azote dans le foie (Braun 2006). 1 = glutaminase, 2 = glutamate déshydrogénase, 3 = cycle de l'urée, 4 = glutamine synthétase.

Dans les hépatocytes de la zone périportale, les ions ammonium sont captés très activement ainsi que la glutamine qui libère d'autres ions ammonium à l'intérieur de la cellule par l'activité de la glutaminase (1) et de la glutamate déshydrogénase (2) qui sont toutes deux préférentiellement localisées dans les mitochondries des hépatocytes périportaux. C'est également dans cette zone que se trouvent de fortes concentrations des enzymes du cycle de l'urée (3); celle-ci est donc synthétisée activement et éliminée vers le sang. Le sang des capillaires sinusoides est ainsi appauvri en ammonium et en glutamine, et enrichi en urée. Dans la zone 3 de l'acinus hépatique, les ions ammonium restants sont également captés mais dans cette zone, ils sont essentiellement transformés en glutamine par la glutamine synthétase (4) dont l'activité est plus forte dans cette zone de l'acinus, où les enzymes de la synthèse de l'urée sont pratiquement absentes. La glutamine rejoint alors la circulation sanguine.

En bilan, le long d'une travée hépatique d'une vingtaine d'hépatocytes, le sang a été :

- presque complètement épuré des ions ammonium,
- chargé en urée,
- plus ou moins débarrassé ou enrichi en glutamine selon les circonstances.

Il faut noter que la synthèse d'urée est possible à partir du NH_3 d'origine ruminale, mais aussi à partir du catabolisme des protéines absorbées au niveau intestinal ou mobilisées. Ces protéines sont issues des protéines nécessaires à la production laitière qui ne sont pas exportées, de toutes les protéines en excès, et de la moitié des protéines nécessaires au besoin d'entretien, l'autre moitié étant considérée comme exportées dans les phanères ou le tractus digestif (*Faverdin 2003*).

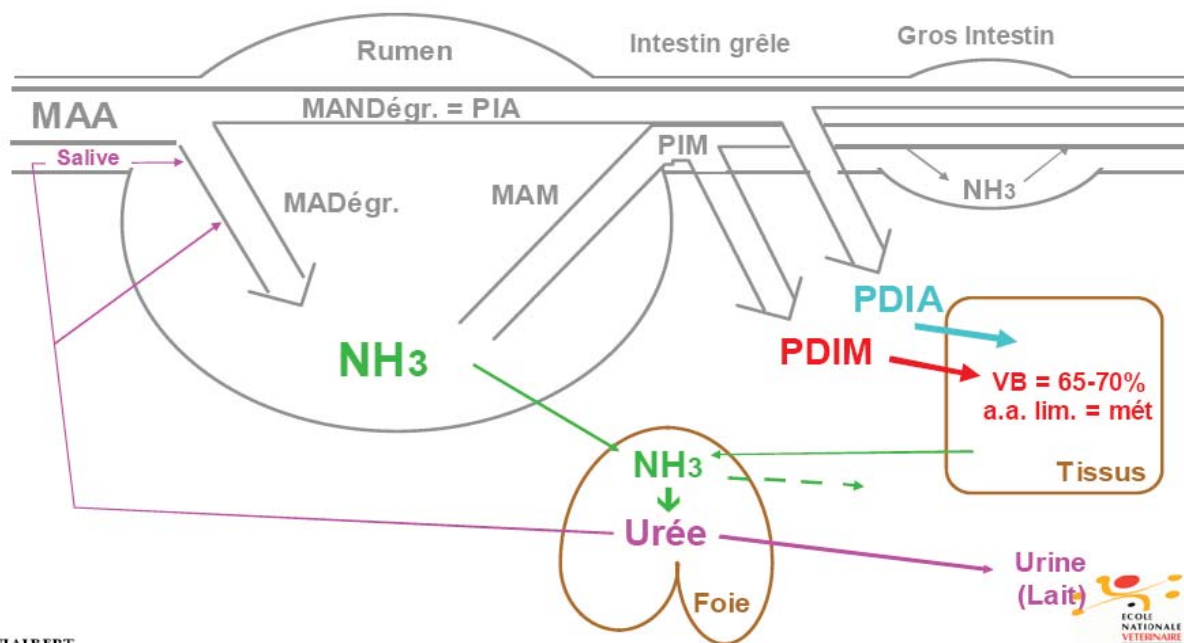
Dans les conditions de base, le cycle de l'urée ne fonctionne pas à son maximum et l'intensité de la production d'urée est essentiellement liée à la disponibilité des substrats. La synthèse d'urée (donc l'élimination d'ammonium) s'adapte donc rapidement à la quantité de protéines ingérées. La concentration des enzymes du cycle de l'urée subit une régulation à long terme en fonction des apports alimentaires : elle est augmentée (x 2 à 3) lorsque les apports protéiques sont accrus ou lors de jeûne prolongé imposant l'utilisation des protéines d'origine musculaire. Elle est diminuée (d'un facteur 2 à 5) chez les sujets recevant des rations à faible teneur protéique. Il en résulte des variations de la concentration plasmatique de l'urée qui peut servir d'indicateur en nutrition.

La synthèse des enzymes du cycle de l'urée est également soumise à des régulations hormonales qui ne sont pas clairement élucidées : elle est augmentée par les glucocorticoïdes (qui favorisent le catabolisme protéique) et le glucagon (qui est augmenté lors de jeûne); en revanche, elle est diminuée par l'insuline.

L'urée n'a pas de rôle biologique propre. Elle permet de détoxifier l'organisme des ions ammonium présents dans le sang.

Elle est alors soit excrétée dans l'urine par le rein, soit recyclée vers le tube digestif par le biais des sécrétions salivaires ou par diffusion à travers la paroi (Figure 15). On estime que la concentration salivaire de l'urée est voisine de 0,6 fois sa concentration plasmatique (Cirio 2000). Le recyclage est très important car il réduit les pertes d'ammoniac et permet de limiter le déséquilibre d'une ration contenant une quantité d'énergie fermentescible supérieure aux capacités de synthèse microbiennes permises par l'azote de la ration. Les mesures de recyclage ont d'ailleurs montré chez le mouton que le recyclage de l'urée à travers la paroi du rumen est une fonction linéaire du rapport CO₂/NH₃ dans le rumen (Remond 1993).

Chez la vache laitière, une partie diffuse dans le lait (taux généralement compris entre 0,25 et 0,32 g/l). (Enjalbert 2008)



F. ENJALBERT

Figure 15 : Utilisation métabolique de l'azote et flux d'urée, (Enjalbert 2006)

b. Sources de variation

i. Excès de PDIN

Une source majeure d'augmentation des taux d'urée et d'ammoniac sanguins chez les bovins est un excès de PDIN. Celui-ci peut être dû à une erreur dans le calcul de la ration, ou à un accident (erreur de distribution). Ceci conduit à une production excessive de NH₃ dans le rumen. Par conséquent, le taux d'urée augmente et lorsque les capacités du foie à détoxifier l'ammoniac sont dépassées, l'ammoniac s'accumule, conduisant à une intoxication.

D'autre part, la qualité des fourrages distribués peut aussi avoir une incidence sur les quantités de PDIN. En effet, l'herbe jeune contient des valeurs élevées de PDIN et par conséquent, la mise à l'herbe avec le passage d'une ration hivernale à la consommation d'herbe jeune riche en MAT représente une augmentation brutale des quantités d'azote ingérées.

ii. Fréquence des repas

Lors de distribution biquotidienne des repas, il a été montré que la concentration plasmatique d'urée augmente, 2 à 4 heures après l'ingestion. Cette augmentation n'est cependant pas présente lors de distributions plus fréquentes (4 fois par jour) (Figure 16).

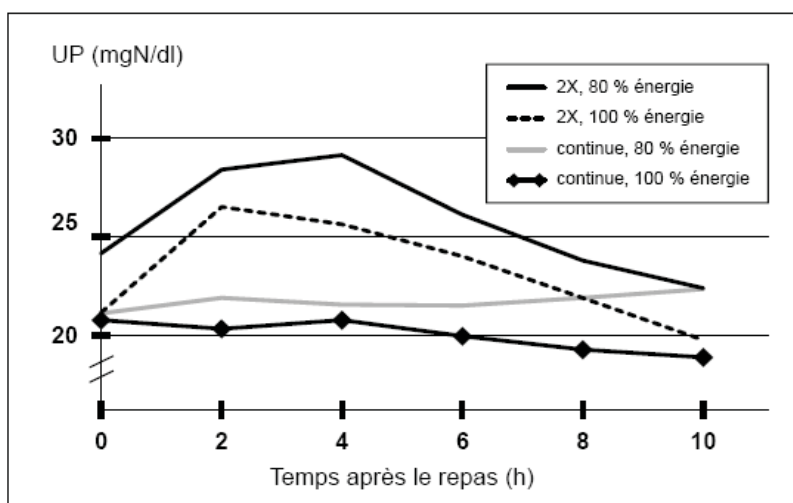


Figure 16 : concentration plasmatique d'urée (UP) chez des vaches recevant différents niveaux d'énergie à différentes fréquences. (D'après *Thomas et Kelly 1976*)

De même, une étude précédente sur l'intoxication de bovins au tourteau de soja a montré une élévation significative de l'urémie dès quatre heures après l'ingestion.

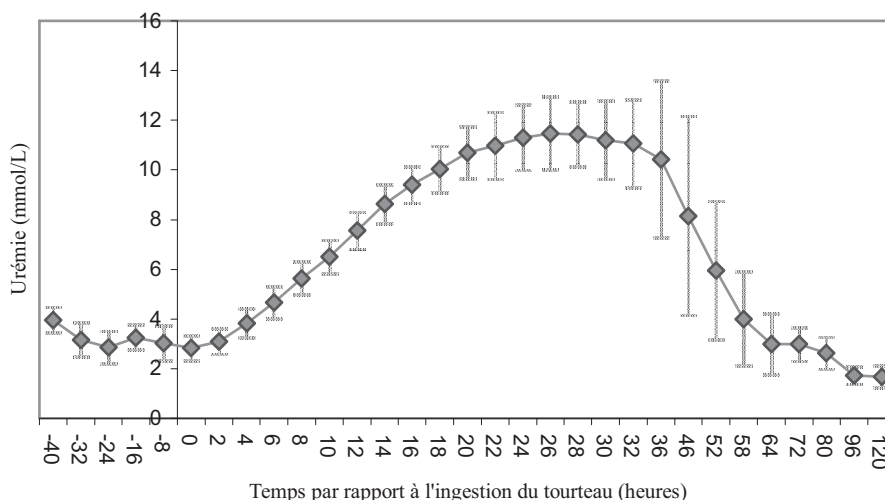


Figure 17 : Evolution de l'urémie dans les heures suivant une intoxication au tourteau de soja 48 (2% du poids vif) (Ferrières 2009)

c. Effets biologiques connus ou supposés

i. Déficit azoté

Lors de déficit azoté de la ration, les apports PDI sont insuffisants pour couvrir les besoins de la microflore (ration <13% MAT). Les fourrages sont alors mal dégradés par les micro-organismes ; il en résulte un temps de séjour des aliments dans le rumen qui est augmenté, et par conséquent une diminution de l'ingestion.

Les conséquences de la carence azotée totale sont alors considérables : baisse de production, amaigrissement, chute du taux protéique du lait, risque accru de cétose, infertilité (Vagneur 1994)

L'urée du lait peut servir d'indicateur de la couverture des besoins azotés ; elle est en effet très liée à l'urémie et présente l'avantage de connaître moins de variations journalières. Une urémie inférieure à 0,25 g/l traduit un déficit azoté. (Enjalbert 2008)

ii. Excès azoté

Les excès azotés de la ration sont généralement plus difficiles à interpréter. Il faut en effet différencier l'excès d'azote dégradable seul (qui conduit à un excès de

PDIMN) et l'excès des apports PDIMN et PDIME avec conservation d'un équilibre PDIMN-PDIME (ce qui revient à étudier l'équilibre PDIE-PDIN).

◇ **Excès de PDIN avec équilibre PDIE-PDIN respecté**

Les matières azotées qui arrivent dans le rumen sont dégradées et réutilisées par les micro-organismes. L'apport PDIE-PDIN étant équilibré, la protéosynthèse microbienne est efficace et tous les produits de la dégradation sont utilisés. La vache absorbe alors dans l'intestin une quantité de protéines supérieure à son besoin. L'excédent sera alors catabolisé et éliminé. La seule conséquence notable est alors un gaspillage protéique et énergétique (lié au catabolisme protéique).

◇ **Apport PDIN > Apport PDIE**

Lors d'apport PDIN > apport PDIE, la protéosynthèse n'est pas optimale et les produits de dégradation de l'azote alimentaire (NH₃) ne sont pas totalement utilisés. Il en résulte une accumulation d'ammoniac dans le rumen. Cet ammoniac traverse alors la paroi et se retrouve dans l'organisme.

○ **Circonstances d'apparition**

L'apparition d'un tel excès est favorisée par plusieurs facteurs :

- un excès de protéines dégradables. Celles-ci sont apportées notamment par l'herbe jeune, la luzerne et leurs ensilages mal conservés, ainsi que par les choux ou le colza fourrager. La distribution de tourteaux, d'urée ou d'autres sources d'azote non protéique en quantité trop élevée est aussi à l'origine d'un excès de protéines dégradables.
- L'insuffisance de glucides fermentescibles (ensilage de maïs trop mur et insuffisamment broyé, sorgho, pomme de terre, fourrages récoltés tardivement)
- Une désynchronisation entre les apports de protéines dégradables et les apports de glucides fermentescibles. Celle-ci

peut être liée à une mauvaise répartition des apports dans le temps ou à un problème de cinétique de la dégradation des protéines. Un régime à base d'ensilage d'herbe mal conservé (d'où protéolyse et forte proportion d'azote ammoniacal) associé à une source d'énergie « lente » (maïs grain par exemple) va produire des taux d'urée sanguine très élevés alors que la ration est équilibrée en théorie. (*Vagneur, 1994*)

- **Pathogénie**

L'accumulation d'ammoniac dans le rumen résulte d'une dysharmonie entre protéosynthèse microbienne et ammoniogenèse. En effet, plus l'azote est dégradable, plus la production d'ammoniac est intense et rapide. A l'inverse, la protéosynthèse est ralentie par le manque de glucides fermentescibles au moment de la libération de l'ammoniac.

- **Forme chronique**

Au sein du rumen, l'ammoniac formé traverse la paroi et gagne le foie où il est détoxiqué. Il s'ensuit une surcharge hépatique, une diminution de la néoglucogenèse et un risque de diffusion de NH_3 , en cas de saturation des capacités hépatiques. Les manifestations de ces formes chroniques d'intoxication sont nombreuses et polymorphes. On constate en effet une augmentation de l'incidence des fièvres de lait, des risques de cétose, d'infertilité, de mortalité embryonnaire, d'avortements, de fourbures, et de mammites au sein des troupeaux où elles sont présentes (*Wolter 1992, Enjalbert 2008*). Une hypothèse fréquemment proposée est une diminution générale de l'immunité en relation avec la toxicité de l'ammoniac. (Figure 18)

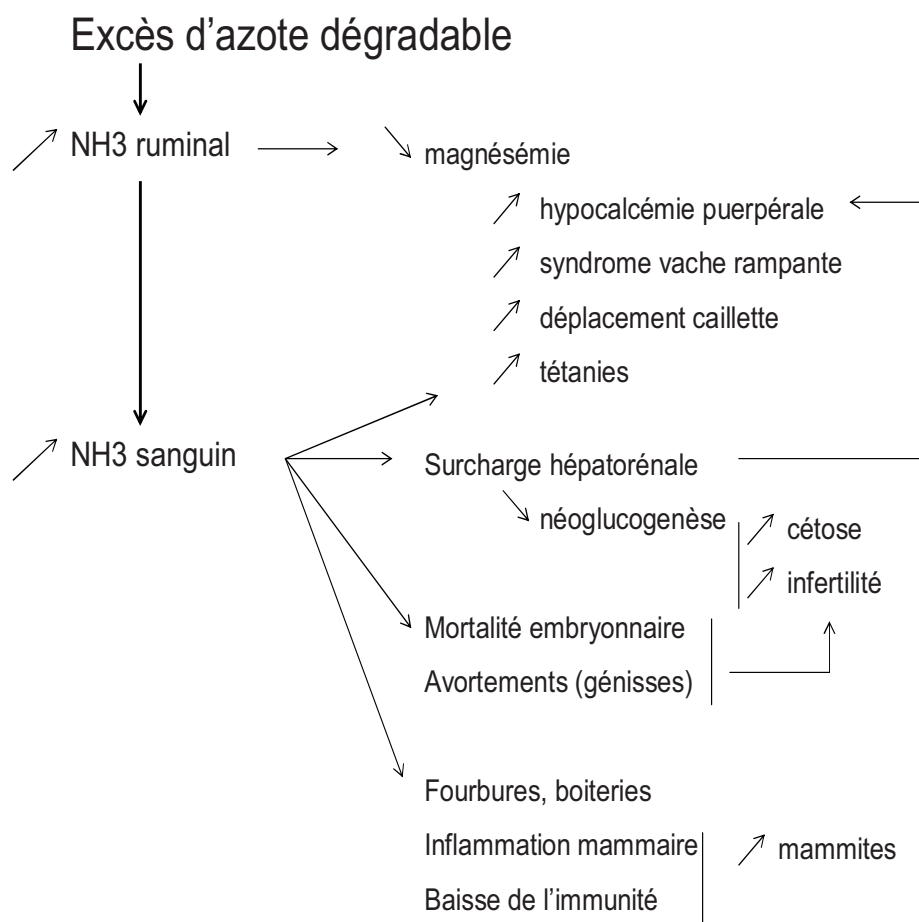


Figure 18 : Conséquences d'un excès d'azote dégradable, (Wolter 1992)

▪ **Forme aiguë**

Lors d'intoxication aiguë, une alcalose ruminale s'installe rapidement pouvant conduire à une carence d'absorption du magnésium et à l'apparition d'une tétanie. Sur le plan métabolique, les capacités du foie sont saturées et l'ammoniac diffuse dans l'organisme. Les manifestations cliniques sont majoritairement nerveuses (tremblements, contractions tétaniformes des membres) associées à des symptômes respiratoires et digestifs (dyspnée, ptyalisme, météorisation). L'issue peut être fatale en quelques heures. (Wolter 1992, Jean-Blain 2002)

II. Matériels et méthodes

1. Lieu de l'étude

L'étude se déroule sur le site de l'ENVT du mois de février au mois de mai de l'année 2008. Les animaux sont logés en stabulation entravée sur tapis et copeaux. Outre le confort des animaux (défumage des tapis biquotidien), ce type de logement permet d'éviter l'ingestion parasite de paille.

Chaque stalle est équipée d'un abreuvoir ; aucun contact entre les animaux n'est possible. Le local permet aussi de disposer sur place du stock des matières premières de la ration, de la réserve de copeaux et d'une balance (afin d'évaluer la prise de poids des animaux). Une paillasse sur laquelle sont réalisées les premières analyses a aussi été aménagée.

2. Animaux

Les animaux utilisés pour l'étude sont des bœufs de race Prim'Holstein âgés de 22 mois et élevés sur le site de l'école vétérinaire de Toulouse (ENVT) depuis l'âge de un jour. Chacun d'eux est équipé d'une canule ruminale qui est bien tolérée par tous les animaux. Pour les besoins de l'étude, les bœufs sont désignés par les lettres A, B, C, D.

Les poids respectifs des animaux au début de l'étude sont de 688, 643, 684, et 663kg, pour les animaux A, B, C, D respectivement.

Quatre rations isoénergétiques à base de luzerne déshydratée, de maïs, de tourteau de soja 48, d'urée et d'aliment minéral et vitaminé (**A.M.V.**) sont calculées grâce au logiciel Larelev® (ENVT). cf. **Annexe 1** et Tableau 4. Les proportions d'apport azoté sont ajustées de manière à obtenir deux rations (16% et 20% MAT) dans lesquelles l'azote est apporté sous la forme de tourteau de soja (apport PDIN et PDIE élevés avec apport PDIN > apport PDIE), et deux rations (20% et 24% MAT)

dans lesquelles une partie de l'azote est apportée sous la forme d'urée (apport de PDIN seulement). La différence entre les rations porte donc sur la teneur en matière azotée totale mais aussi sur la nature des sources d'azote. En effet, compte tenu de la vitesse de dégradation, la production d'ammoniac dans le rumen est nettement plus rapide avec les rations contenant de l'urée qu'avec les rations à base de tourteau.

Tableau 4 : Composition des rations (aliment en kg/l)

	Ration 1	Ration 2	Ration 3	Ration 4
	16% MAT	20% MAT Soja	20% MAT urée	24% MAT
Luzerne	13	13	13	13
Mais concassé	1,8	0,3	1,8	0,3
Tourteau de soja 48	0,4	1,9	0,4	1,9
Urée	0	0	0,21	0,21
AMV 15/11/6	0,1	0,1	0,1	0,1

Le schéma expérimental correspond à un carré latin. Ainsi, chaque animal (A, B, C, D) reçoit chaque ration (16, 20s, 20u, 24) pendant un mois, l'ordre de succession des rations ayant été défini de manière aléatoire au début de l'étude (Tableau 5). Les trois premières semaines permettent l'adaptation métabolique et l'adaptation de la flore ruminale à la nouvelle ration. C'est durant la dernière semaine de chaque mois que les prélèvements ont été réalisés.

Tableau 5 : Succession des rations pour chaque animal durant l'étude

	A	B	C	D
Mois 1	24 % MAT	16 % MAT	20 % Urée	20 % Soja
Mois 2	20 % Soja	24 % MAT	16 % MAT	20 % Urée
Mois 3	16 % MAT	20 % Urée	20 % Soja	24 % MAT
Mois 4	20 % Urée	20 % Soja	24 % MAT	16 % MAT

La ration est distribuée matin et soir à heures fixes (8h et 18h). Les quantités de chaque aliment sont pesées rigoureusement à chaque distribution, et les refus sont pesés et enregistrés.

3. Prélèvements sanguins

a. Immunologie

Les tests destinés à rechercher une différence de réactivité des neutrophiles en fonction de la teneur de la ration en azote ont été réalisés *ex vivo*.

Ces tests sont réalisés à différents moments de la journée par rapport à la distribution de la ration :

- des prélèvements réalisés à 9h, soit une heure après la distribution de la ration, avec trois répétitions à des jours différents
- un prélèvement est réalisé à 13h, soit 5h après la distribution du matin.

i. Prélèvements sanguins

Sept tubes de sang sont prélevés par animal (tubes ACD [Acid Citrate Dextrose] Vacutainer, 7ml) de façon à obtenir un volume de 50 ml de sang environ. Le sang est prélevé à la veine jugulaire après désinfection de la zone de ponction avec une solution iodée, le site de prélèvement ayant été rasé avant le début de l'étude. La latéralisation des prélèvements est régulièrement inversée afin de limiter la phlébite.

Les tubes sont agités par retournement (x5), puis immédiatement déposés dans la glace jusqu'à l'étape de purification des neutrophiles.

ii. Numération et formule sanguine

Un tube EDTA est prélevé en même temps que les tubes ACD afin de réaliser une numération et une formule sanguine.

b. Biochimie

Le jour du prélèvement, les différents échantillonnages sont réalisés toutes les 2 heures de 8 h à 20 h.

Chaque point de prélèvement comprend :

- Un **prélèvement sanguin**
- Un **prélèvement ruminal**
- Un **prélèvement urinaire**, réalisé lors des mictions spontanées dans les 15 minutes précédant ou suivant l'heure du prélèvement (soit entre 15h45 et 16h15 pour le point de 16h)

Les points de prélèvement sont toujours réalisés dans le même ordre (à part pour l'urine) : A suivi de B, puis de C, et enfin D.

Quatre tubes héparinés sont prélevés ; ils sont destinés aux analyses suivantes :

i. les gaz sanguins

Les gaz sanguins sont mesurés dans les 15 minutes suivant le prélèvement, à l'aide d'un analyseur portable (VetStat Electrolyte and Blood Gaz Analyser ; IDEXX) munis de cassettes (VetStat fluído-therapie/Acide-Base ; IDEXX, Westbrook, USA). L'appareil est placé dans une pièce climatisée.

Les paramètres ainsi mesurés sont :

- **pH sanguin**
- **pCO₂**
- **TCO₂**
- **ionogramme (Na⁺, K⁺, Cl⁻, HCO₃⁻)**

L'analyseur calcule ensuite, à partir des paramètres mesurés, les paramètres suivants :

- la concentration en ions bicarbonates [HCO₃⁻] :

$$\log [\text{HCO}_3^-] = \text{pH} + \log \text{pCO}_2 - 7,608$$

Cette méthode de calcul découle de l'équation d'Henderson-Hasselbach :

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log ([\text{HCO}_3^-]/[\text{H}_2\text{CO}_3])$$

Or le pKa du couple = 6,1 et $[\text{H}_2\text{CO}_3] = 0,03 \times \text{pCO}_2$ avec 0,03 = constante de solubilité du CO_2 dans le plasma (Carlson, 1997).

- la teneur en CO_2 totale : $\text{TCO}_2 = [\text{HCO}_3^-] + 0,03 \text{ pCO}_2$
- le trou anionique : $\text{TA} = ([\text{Na}^+] + [\text{K}^+]) - ([\text{Cl}^-] + [\text{HCO}_3^-])$ qui correspond donc à la différence entre les cations mesurés (95 % des cations plasmatiques totaux) et les anions mesurés (85 % des anions plasmatiques totaux)

ii. Ammoniémie

Le tube de sang est placé directement dans la glace après le prélèvement.

Ensuite selon l'heure du prélèvement,

- Un dosage de l'ammoniémie est effectué dans les 15 minutes suivant le prélèvement au laboratoire de l'ENVT.
- Ou bien alors le tube est centrifugé dans les 10 minutes, puis le plasma est congelé à -80°C dans les 30 minutes.
Cette deuxième alternative est utilisée pour les prélèvements de 18 et 20h réalisés en dehors des heures d'ouverture du laboratoire. Les échantillons sont analysés le lendemain en début de journée avec les prélèvements réalisés à 8 h.

iii. Archivage

Ces deux tubes sont directement déposés dans de la glace après la ponction et centrifugés dans les 10 minutes qui suivent. Le plasma est séparé du culot, puis il est ensuite congelé à - 80°C dans les 30 minutes.

iv. Autres analyses

○ *Liquide ruminal*

Des prélèvements de jus de rumen sont effectués selon la même cinétique couvrant la journée (de 8h à 20h). Ainsi sont mesurés :

- le pH ruminal (pH-mètre)
- l'ammoniac ruminal
- les acides gras volatils (acide acétique (C2), acide propionique (C3), acide butyrique (C4), acide iso butyrique (iC4), acide valérique (C5), acide iso-valérique (iC5)) par chromatographie en phase gazeuse.

○ *Urine*

Sur chaque échantillon d'urine récoltée, une mesure du pH (pH-mètre), une bandelette urinaire (Combur Test®), et une réaction de Heller sont réalisés.

Une aliquote est ensuite congelée (-80°C).

○ *Analyses sur plasma*

A la fin de l'ensemble de la manipulation, le plasma est décongelé et les paramètres suivants sont mesurés au laboratoire de l'ENVT :

- **Urée**
- **Glucose**
- La créatine kinase (**CK**)
- Les Gamma Glutamyl Transpeptidase (**GGT**)
- Les transaminases (**ASAT**)

- Le Cuivre (**Cu**)
- Le Zinc (**Zn**)

4. Purification des neutrophiles

Les tubes, placés sur la glace après prélèvement, sont centrifugés puis le plasma est récupéré et stocké dans deux tubes Falcon® 15ml ; le buffy coat est quant à lui prélevé pour la préparation des PBMC. Les neutrophiles sont purifiés et la concentration est ajustée à $5 \cdot 10^6$ cellules/ml (protocole complet en **Annexe 2**)

5. Principes de la cytométrie en flux

Les propriétés des neutrophiles (pureté de l'échantillon, expression des marqueurs membranaires, phagocytose et diapédèse) sont analysées par cytométrie en flux. Cette méthode permet d'analyser les propriétés des cellules en les exposant une à une à un faisceau laser. Un capteur permet d'analyser les propriétés de la lumière diffractée et émise par cellules, ainsi que la fluorescence des anticorps marqués.

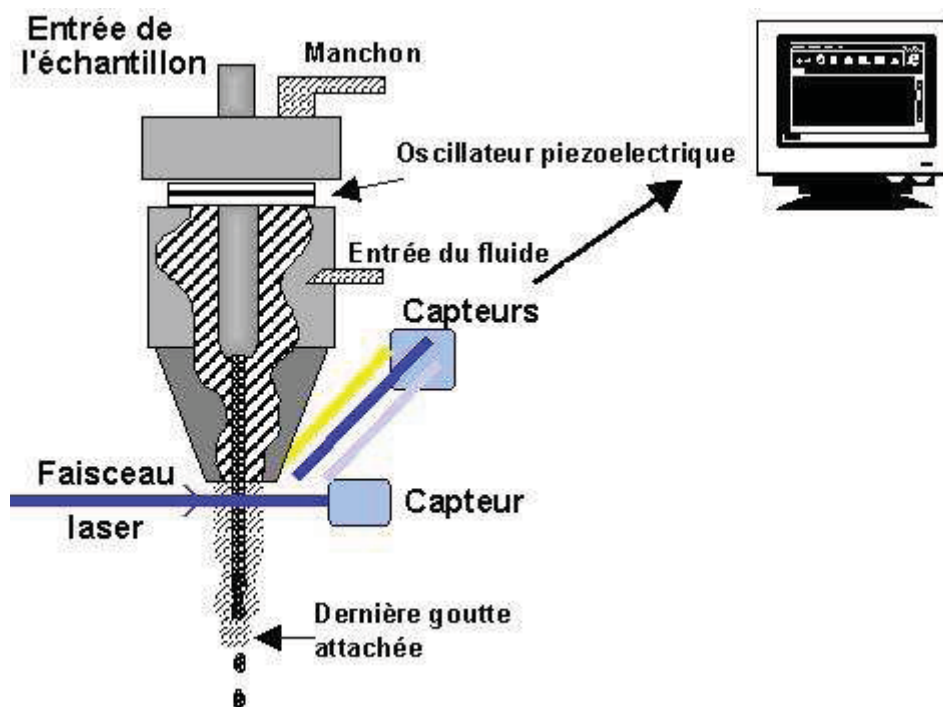


Figure 19 : Principe de la cytométrie de flux, d'après <http://pedagogie.acamiens.fr/svt/info/logiciels/cytometrie/Cytometrie2.html#principe>

L'échantillon à analyser est constitué d'une suspension cellulaire. Les cellules sont aspirées à l'aide d'un système de pompe et traversent le faisceau laser ce qui permet d'évaluer les paramètres des cellules.

La lumière diffractée par les cellules permet ainsi de mesurer la taille de ces dernières (paramètre Forward Scatter = **FSC**) et la lumière diffractée à 90° renseigne sur la granulosité (paramètre Side Scatter = **SSC**). Chaque cellule est alors représentée par un point sur le cytogramme. L'échantillon est donc visualisé sous la forme d'un nuage de points et l'analyse des paramètres taille / granulosité des cellules permet alors d'identifier la population neutrophilique. Figure 20.

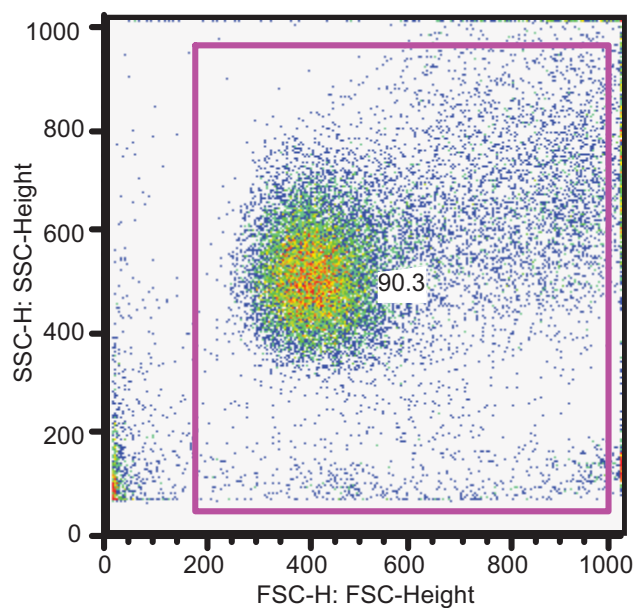


Figure 20 : Identification de la population de cellules dont les critères de taille / granulosité correspondent à ceux des neutrophiles.

L'utilisation d'anticorps couplés à des fluorochromes permet de détecter la présence de marqueurs à la surface des cellules. L'incubation avec des anticorps anti-CD11b marqués permet ainsi d'identifier avec certitude les neutrophiles.

6. Analyse de l'expression des récepteurs membranaires

a. Expression de CD11b et CD62L

L'expression des marqueurs de surface des neutrophiles est évaluée par cytométrie en flux à l'aide d'un analyseur (FACScalibur, Becton-Dickinson).

Des solutions indépendantes d'anticorps sont préparées le premier jour de chaque semaine où les analyses sont faites. Les cellules sont incubées avec les anticorps liés à un fluorochrome. La fluorescence des neutrophiles qui est alors proportionnelle à la quantité d'anticorps fixé sur les cellules est analysée avec le cytomètre.

Chaque marquage est réalisé en triplicate. Trois tubes servent de contrôle : l'un contient seulement la suspension cellulaire, les deux autres sont des simples marquages CD11b ou CD62L pour le réglage du cytomètre (protocole complet en **Annexe 3**).

7. Evaluation de la diapédèse

La diapédèse est évaluée en étudiant le passage des neutrophiles à travers une membrane à micropores (Transwell®) (Figure 21) sur une plaque comportant 24 puits. (Protocole complet en **Annexe 4**)

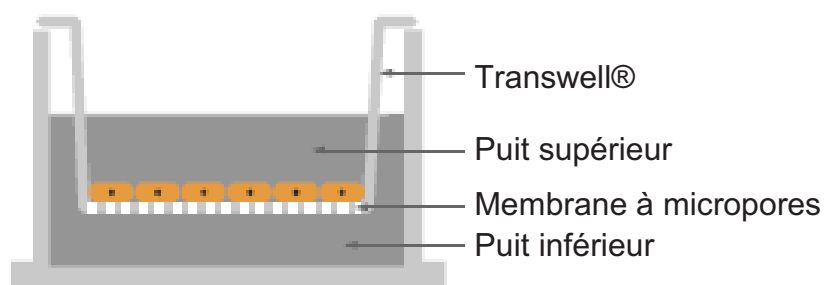


Figure 21 : Schéma du dispositif de mesure de la diapédèse (Transwell®) (*MatTek Corporation, 2009*)

Deux chimioattractants sont utilisés :

- du sérum activé par le Zymosan (ZAS), qui contient du C5a
- rhIL-8, interleukine-8 recombinante humaine.

Le troisième puits (Figure 20) contient seulement du milieu (HBSS), ce qui permet d'évaluer les capacités de migration des cellules, en l'absence de chimioattractant. Cela traduit les capacités de déformation et de migration spontanée des neutrophiles.

Le milieu contenant le chimioattractant (1,5ml) est déposé dans le puits suivant le plan de plaque (Figure 22). La suspension cellulaire est déposée dans le puits supérieur et la plaque est incubée 30min à 37°C. Après fixation des cellules du puits inférieur, un nombre constant de billes fluorescentes est ajouté dans chaque tube.

Le contenu du puits inférieur est ensuite analysé par cytométrie en flux. Le rapport nombre de neutrophiles / billes permet d'évaluer l'intensité de la diapédèse à travers la membrane.

	HBSS	RhIL-8	ZAS
A			
B			
C			
D			

Figure 22 : Plan de plaque du test de diapédèse.

8. Evaluation de la phagocytose

Les capacités de phagocytose des neutrophiles sont étudiées grâce à une méthode utilisant la cytométrie en flux.

Deux tubes sont utilisés par animal. Dans le premier tube des particules de zymosan marquées (FITC-OZP) par le fluorochrome FITC sont incubées avec les neutrophiles pendant 30 min. Des particules non marquées sont incubées avec les cellules dans le deuxième tube. L'analyse permet de détecter l'intensité de fluorescence des neutrophiles, ce qui traduit l'intensité de la phagocytose (l'échantillon avec les levures non marquées servant de témoin). (Protocole complet en **Annexe 5**)

9. Analyse de la bactéricidie

a. Préparation des réactifs

La bactéricidie est étudiée par une méthode utilisant une réaction colorimétrique.

Une suspension de *Staphylococcus aureus* dont la concentration initiale est connue, est incubée avec les neutrophiles. Des dilutions sériées de la suspension bactérienne sont réalisées, de façon à réaliser une courbe standard (Figure 23). Un substrat coloré est ensuite ajouté dont le changement de couleur est proportionnel à la quantité de bactéries présente dans le puits. La densité optique est ensuite mesurée à 560nm. (Protocole complet en **Annexe 6**)

La courbe standard de dilution permet d'établir une relation entre le nombre de bactéries vivantes et la densité optique mesurée. Cette relation, calculée à chaque analyse, permet ensuite de déterminer le nombre de bactéries encore vivantes après incubation avec les neutrophiles (= R) (Figure 24).

Le pourcentage de bactéricidie peut alors être calculé suivant la formule :

$$\% \text{ bactéricidie} = \frac{1.10^8 - R}{1.10^8} \times 100.$$

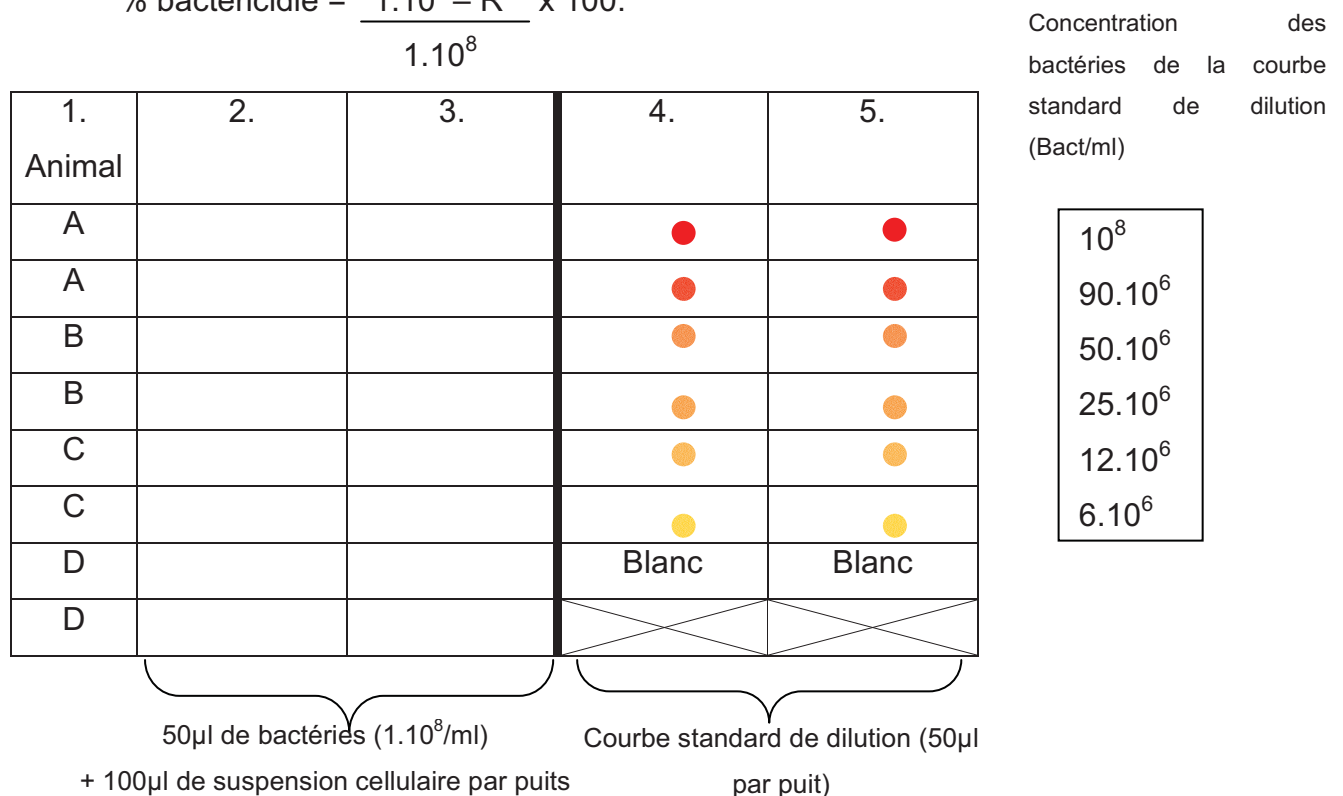


Figure 23 : Plan de plaque du test de bactéricidie

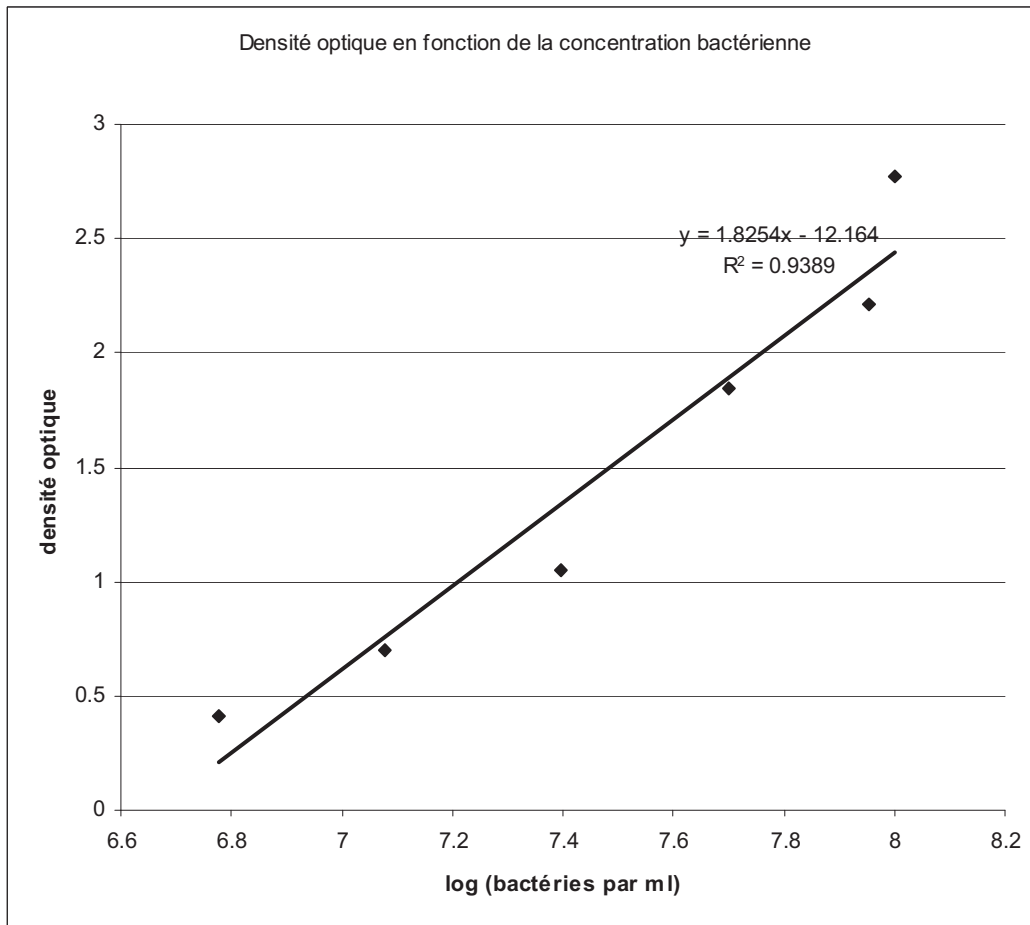


Figure 24 : Exemple de courbe standard établissant la relation entre la densité optique mesurée et la concentration bactérienne (Mois 4, jour 3).

10. Analyse statistique

L'analyse statistique est effectuée grâce au logiciel R 2.9.0. Plusieurs modèles statistiques sont testés.

Dans un premier temps, nous avons étudié les effets de l'urémie et de l'ammoniémie sur les fonctions neutrophiliques. Les valeurs instantanées des deux paramètres sont mesurées au moment des prélèvements des cellules et un modèle statistique a permis de rechercher les corrélations (effet instantané, cf. *infra*).

D'autre part, un modèle a permis d'étudier les effets cumulatifs des paramètres étudiés en prenant en compte l'aire sous la courbe de la cinétique du paramètre étudié.

Deux derniers modèles ont permis d'étudier l'effet des rations et de la nature de la source d'azote sur les fonctions neutrophiliques.

Les modèles statistiques utilisés permettent d'isoler les effets Animal et Mois dans chaque analyse, et ainsi d'identifier précisément les corrélations entre les paramètres biochimiques et immunologiques.

a. Effet instantané

$$Y = \mu + \text{Animal} + \text{Mois} + \text{NH}_3 (\mu' + \text{Animal} + \text{Mois}) + \varepsilon$$

Ce modèle permet d'étudier la corrélation entre la valeur du paramètre immunologique et la valeur du paramètre biochimique (NH₃ et Urée) à l'instant t du prélèvement.

b. Effet cumulatif

$$Y = \mu + \text{Animal} + \text{Mois} + \text{Paramètre Biochimique} + \varepsilon$$

Dans ce modèle, Y représente le paramètre immunologique testé (expression des marqueurs membranaires, etc...); on étudie la corrélation entre le paramètre immunologique et le paramètre biochimique (NH₃, urée, bicarbonatémie, trou anionique, etc...). L'effet du paramètre biochimique est évalué en considérant l'aire sous la courbe de la cinétique journalière du jour correspondant au prélèvement sanguin.

c. Autres modèles :

Le modèle suivant est utilisé pour étudier l'effet de la ration :

$$Y = \text{Animal} + \text{Mois} + \text{Ration} + \varepsilon$$

Grâce à ce modèle, on étudie l'effet de la ration sur le paramètre immunologique. On compare les rations deux à deux, afin de déceler une différence significative du paramètre immunologique entre les deux rations.

Un dernier modèle permet d'analyser l'effet de la nature de la source azotée de la ration (Soja vs Urée) :

$$Y = \mu + An + Mois + Soja + Urée + Soja \times Urée + \varepsilon$$

III. Résultats

1. Pureté des isollements cellulaires

Les tests destinés à évaluer les fonctions neutrophiliques dans cette étude nécessitent au préalable la purification des cellules. En effet, la présence de populations cellulaires contaminantes (comme les éosinophiles par exemple) pourrait fausser les résultats en diminuant l'activité propre des neutrophiles. En effet, les éosinophiles contiennent dans leurs granules diverses protéines dont des catalases. Or, celle-ci inhibe plus de 60% de la chimioluminescence induite par le PMA (*Rinaldi 2007*). D'autres protéines des éosinophiles (telles que la protéine majeure basique) peuvent activer les neutrophiles induisant une augmentation de la chimioluminescence (*Moy et al. 1990*).

Par ailleurs, les modifications de la quantité d'azote de la ration pourraient modifier les propriétés physiques des cellules, et ainsi la pureté des neutrophiles isolés.

C'est pourquoi, avant d'exploiter les données collectées, nous avons vérifié la pureté des neutrophiles après séparation. L'analyse de la pureté cellulaire a été réalisée par cytométrie en flux après marquage avec un anticorps anti-CD11b.

L'ajustement des fenêtres électroniques de taille et de granulosité (Fig 25A) permet d'identifier des cellules dont les critères de taille et de granulosité correspondent à ceux des neutrophiles (Fig 25A). Le marquage avec l'iodure de propidium permet d'estimer la proportion de cellules mortes dans l'échantillon (Fig 25B). A cette détermination de la pureté sur des critères morphologiques, nous avons associé le marqueur de surface CD11b (Fig 25C) qui est fortement exprimé par les neutrophiles. On peut ainsi déterminer avec précision le pourcentage de neutrophiles présents dans l'échantillon.

Les valeurs de la pureté des cellules isolées en fonction de la date de prélèvement et de l'animal sont présentées sur la Figure 26.

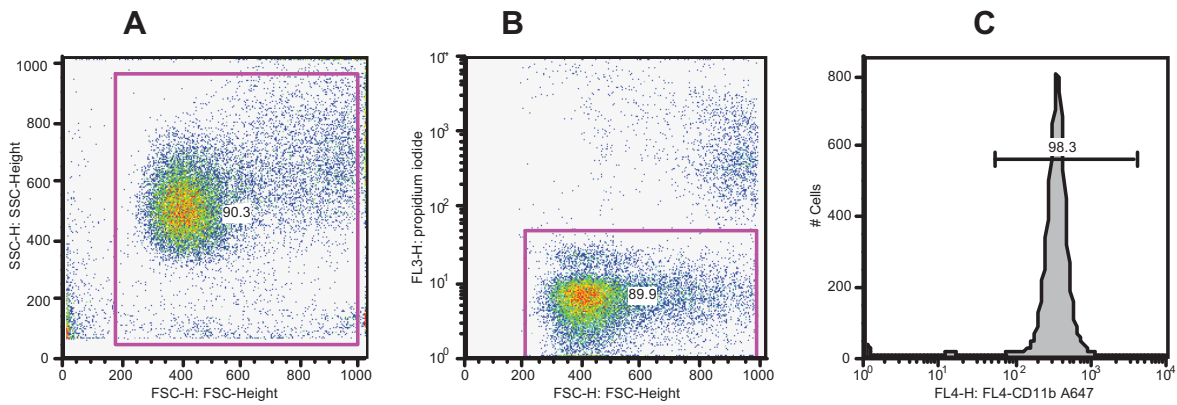


Figure 25 : Détermination de la pureté des neutrophiles par cytométrie de flux.

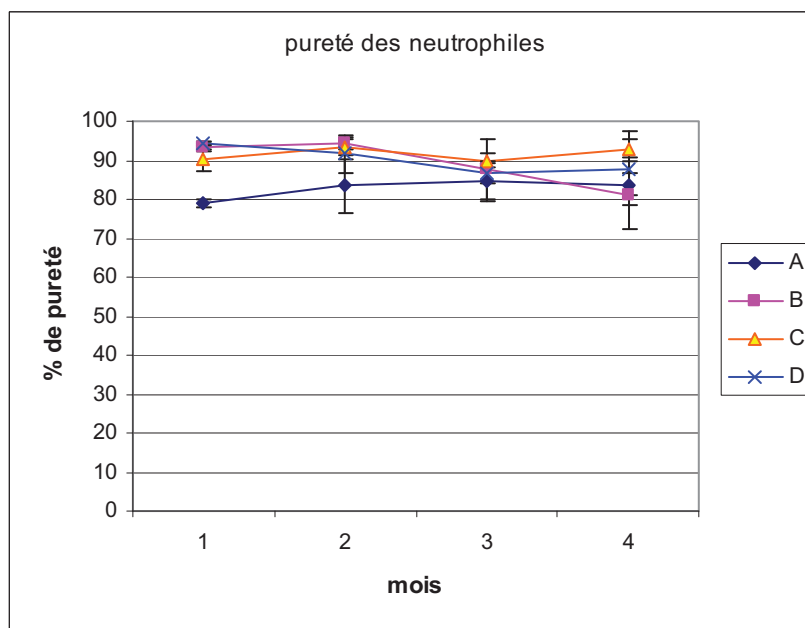


Figure 26 : Moyenne mensuelle de la pureté des neutrophiles.

Les données présentées dans la Figure 26 montrent qu'il existe des variations de la pureté cellulaire au cours du temps. En outre, la pureté de la préparation cellulaire de l'animal A est toujours inférieure à celle des trois autres bovins. La proportion de neutrophiles était régulièrement supérieure à 90% dans nos préparations.

Ainsi, la pureté des neutrophiles (88.3% tous prélèvements confondus) est homogène et suffisamment élevée pour la réalisation des différents tests fonctionnels immunologiques.

a. Analyse statistique

i. Effet instantané

Aucune corrélation n'a été observée entre les paramètres biochimiques instantanés (urée ou NH_3) et la pureté des neutrophiles.

ii. Effet cumulatif

- Une corrélation significative est observée entre la valeur des bicarbonates et la pureté des neutrophiles ($p < 0.01$). Malgré un effet animal très marqué, l'augmentation de la valeur de HCO_3^- est corrélée à une augmentation de la pureté des neutrophiles (Figure 27).

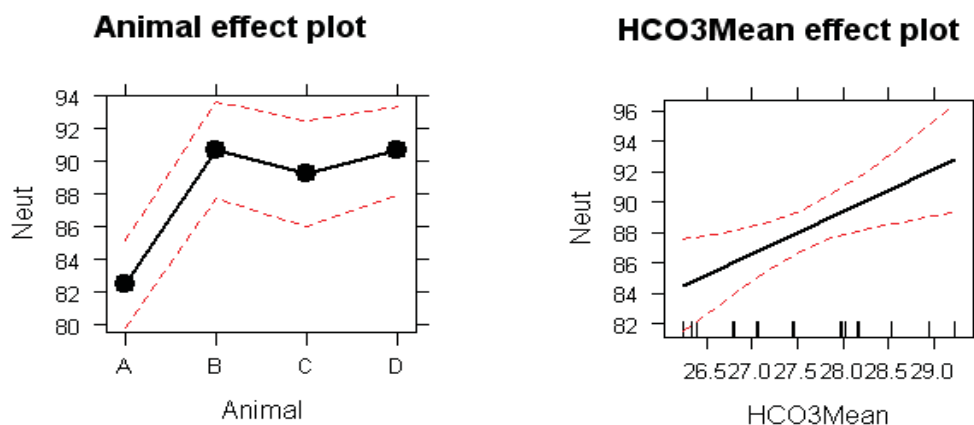


Figure 27 : Effets animal et HCO_3^- sur la pureté des neutrophiles (Logiciel R2.9.0®)

- Parmi les autres valeurs de biochimie enregistrées au cours de l'essai, nous avons constaté qu'il existe une corrélation entre la concentration du cuivre et de l'iode plasmatiques et la pureté des neutrophiles (Figure 28)

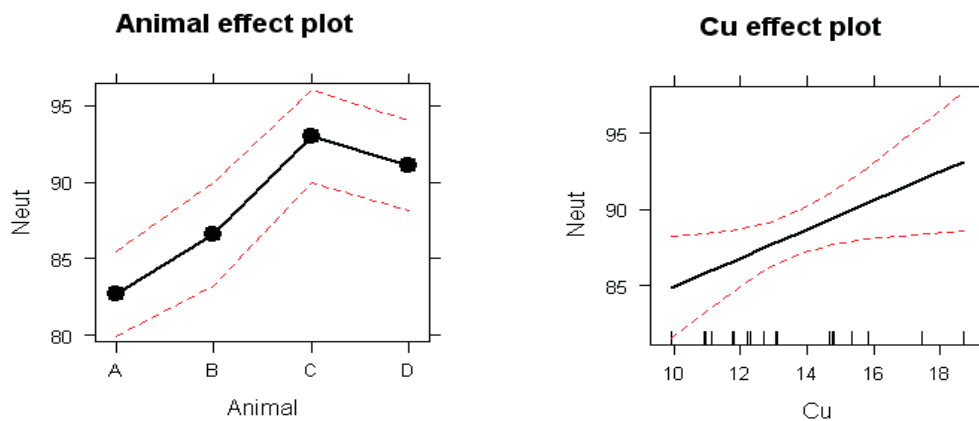


Figure 28 : Effets animal et Cu sur la pureté des neutrophiles (*Logiciel R2.9.0®*)

2. Expression des récepteurs membranaires

a. Expression du marqueur CD11b

L'analyse en cytométrie permet de mesurer l'expression du CD11b après marquage avec un anticorps anti-CD11b fluorescent. (Figure 29). L'intensité moyenne de fluorescence (Mean Fluorescence Intensity = **MFI**) des cellules ainsi marquées est déterminée à chaque analyse.

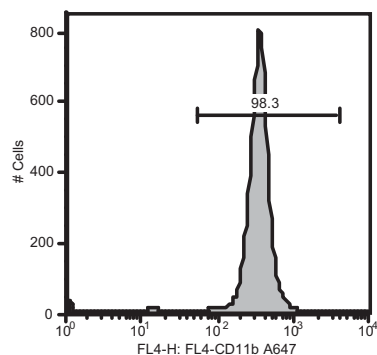


Figure 29 : Expression de la sous unité CD11b

Les valeurs ponctuelles d'intensité moyenne de fluorescence, comprises entre 300 et 700 permettent de valider les résultats obtenus et le marquage des cellules par les anticorps. Les moyennes mensuelles de MFI présentées sur la figure 30 montrent qu'il existe des variations liées au jour de prélèvement. Par ailleurs, la variabilité individuelle semble très forte. En effet, la MFI semble toujours plus élevée pour l'animal A quelle que soit la ration ingérée.

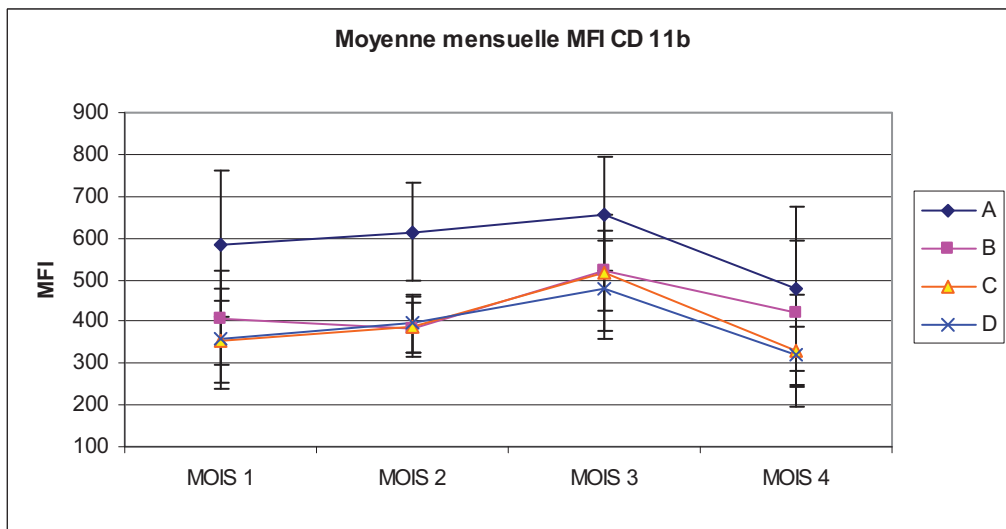


Figure 30 : Moyenne mensuelle de la MFI CD11b par animal

L'analyse statistique montre que les variations d'expression du marqueur CD11b ne sont corrélées à aucun des paramètres enregistrés.

b. Expression de la L-sélectine CD62L

Afin de mesurer l'expression de la sélectine CD62L à la surface des neutrophiles, nous avons marqué les cellules avec un anticorps fluorescent (FITC) et spécifique de ce marqueur. L'intensité moyenne de fluorescence permet d'estimer l'expression relative à la surface des neutrophiles, comme présenté dans la figure 31.

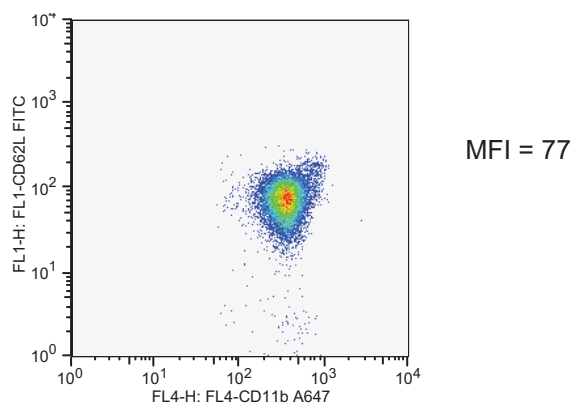


Figure 31 : Analyse de la co-expression de CD11b et CD62L à la surface des neutrophiles par cytométrie en flux

Les résultats de la mesure de la MFI de l'expression de CD62L sont présentés à la figure 32. La MFI varie de 30 à 135 avec une valeur moyenne de 88 tous prélèvements confondus. La variabilité journalière et surtout individuelle semble

marquée, l'animal A ayant régulièrement des valeurs de MFI élevées, alors que l'animal D a des valeurs régulièrement plus faibles que les autres animaux.

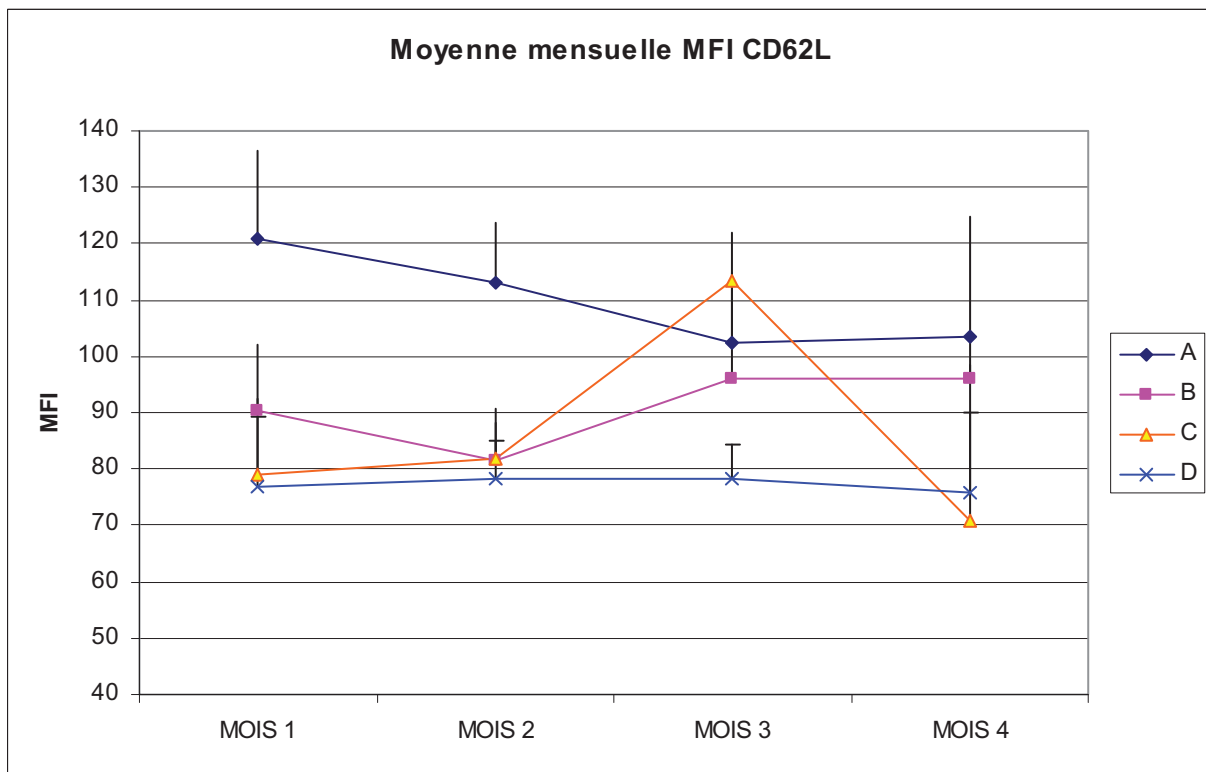


Figure 32 : Moyenne mensuelle de la MFI CD62L pour chaque animal

i. Analyse statistique

◇ Effet instantané

L'analyse avec le modèle :

$$[Y = \mu + \text{Animal} + \text{Mois} + \text{NH}_3 (\mu' + \text{Animal} + \text{Mois}) + \varepsilon]$$

montre une corrélation entre l'urémie au moment du prélèvement et l'intensité du marquage de CD62L sur les neutrophiles ($p < 0,05$). (Figure 33). Par ailleurs la ration ($p < 0,01$) et la présence de soja ($p < 0,05$) dans celle ci ont un effet sur l'urémie.

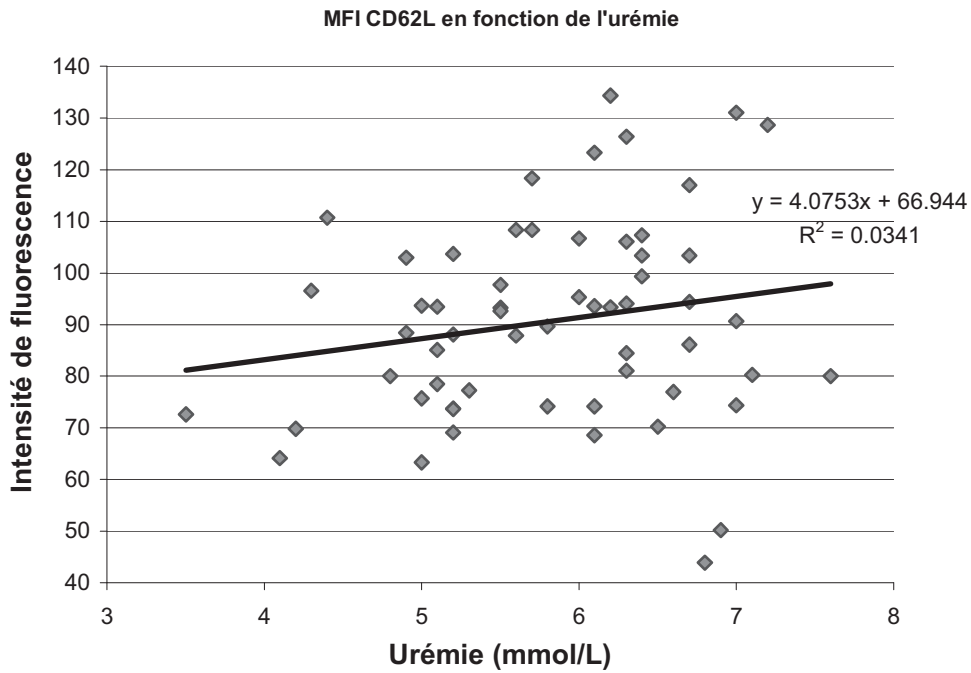


Figure 33 : Expression de CD62L en fonction de l'urémie (Logiciel Excel®).

◇ **Effet cumulatif**

L'analyse statistique utilisant le modèle :

$$(Y = \mu + \text{Animal} + \text{Mois} + \text{Paramètre Biochimique} + \varepsilon)$$

montre plusieurs corrélations :

- Entre les valeurs de bicarbonates sanguins et l'expression de CD62L ($p < 0,05$).
A noter qu'un effet animal est montré par l'analyse statistique.

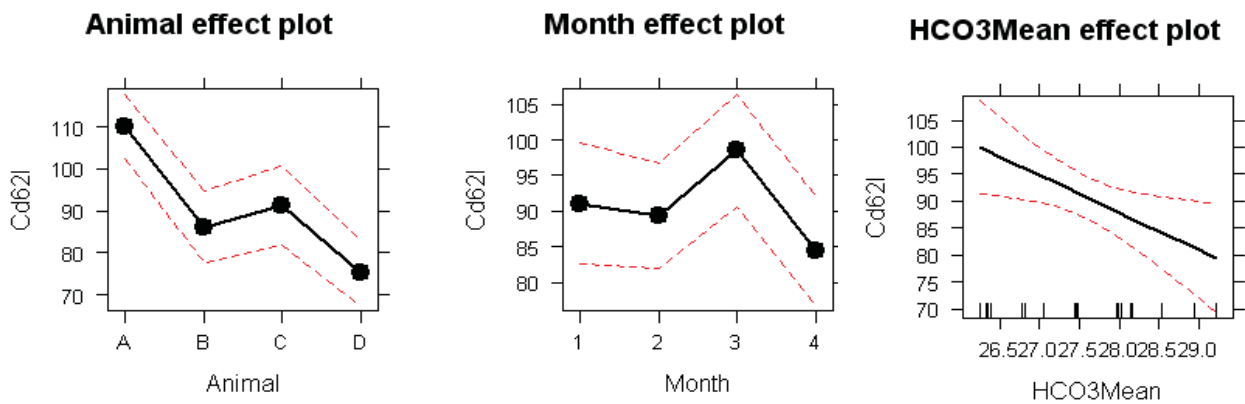


Figure 34 : Effets animal, mois et HCO_3^- sur l'expression de CD62L (Logiciel R2.9.0®).

L'expression de la L-sélectine à la membrane des neutrophiles est inversement corrélée à la valeur de HCO_3^- (Figure 34).

D'autres corrélations ont été notées :

- Une corrélation entre l'expression de CD62-L et le trou anionique (Figure 35), ($p < 0,001$). Une augmentation d'expression de CD62L est corrélée à l'augmentation du trou anionique.
- Une corrélation entre la concentration en acides gras non estérifiés et l'expression de CD62L ($p < 0,001$) (Figure 36)

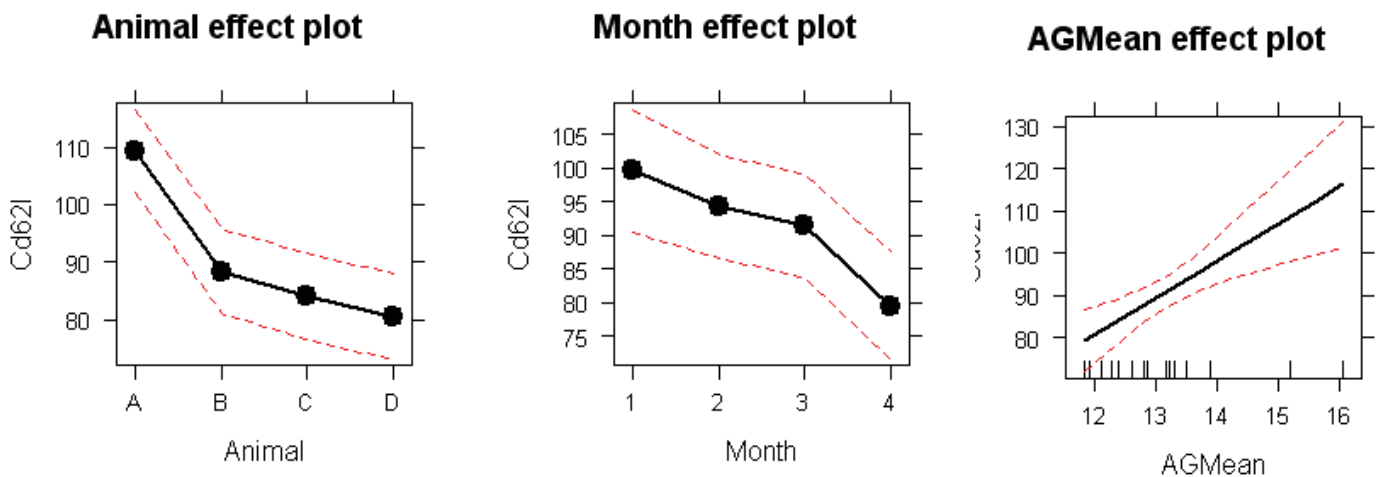


Figure 35 : Effets animal, mois et trou anionique (AG = Anion Gap) sur l'expression de CD62L (Logiciel R2.9.0®).

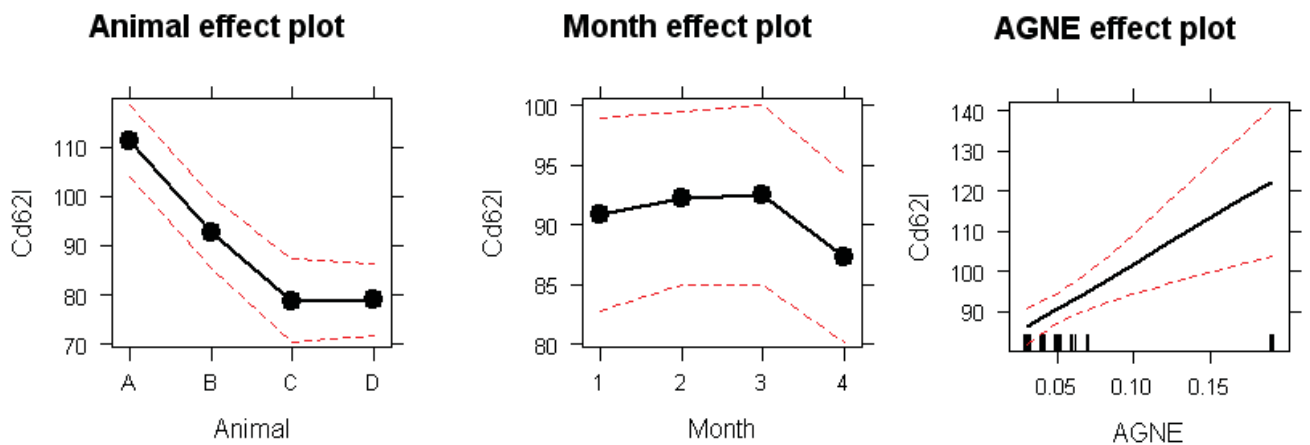


Figure 36 : Effets animal, mois et AGNE sur l'expression de CD62L (Logiciel R2.9.0®).

L'augmentation de l'expression de CD62L est corrélée à une augmentation des acides gras non estérifiés.

◇ Autre modèle

Le modèle statistique analysant l'effet de la source azotée :

$$Y = \mu + An + Mois + Soja + Urée + Soja \times Urée + e$$

permet de rechercher l'impact de la nature de la source d'azote sur les variations des paramètres immunologiques. On recherche alors l'effet d'un apport de soja seul (rations 16% et 20% soja) ou associé à un apport d'urée (rations 20% urée et 24%).

Les résultats de l'analyse statistique montrent que la présence de soja dans la ration est relié à une modification de l'expression de CD62L ($p < 0.05$).

3. Diapédèse

Le nombre de neutrophiles ayant traversé la membrane, spontanément ou en réponse à un chimioattractant a été dénombré par cytométrie de flux.

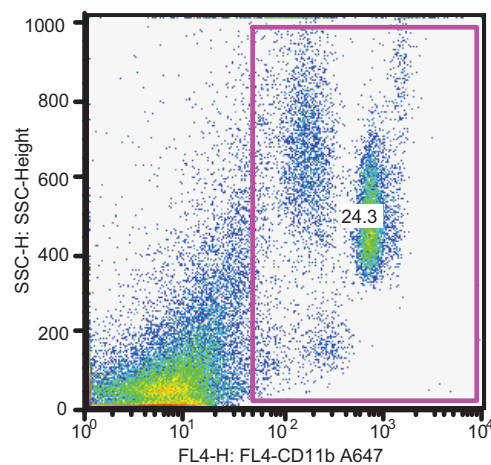


Figure 37 : Ajustement de la première fenêtre graphique.

L'ajustement de la première fenêtre graphique permet de sélectionner les neutrophiles et les billes en fonction des critères de taille et de granulosité. (Figure 37).

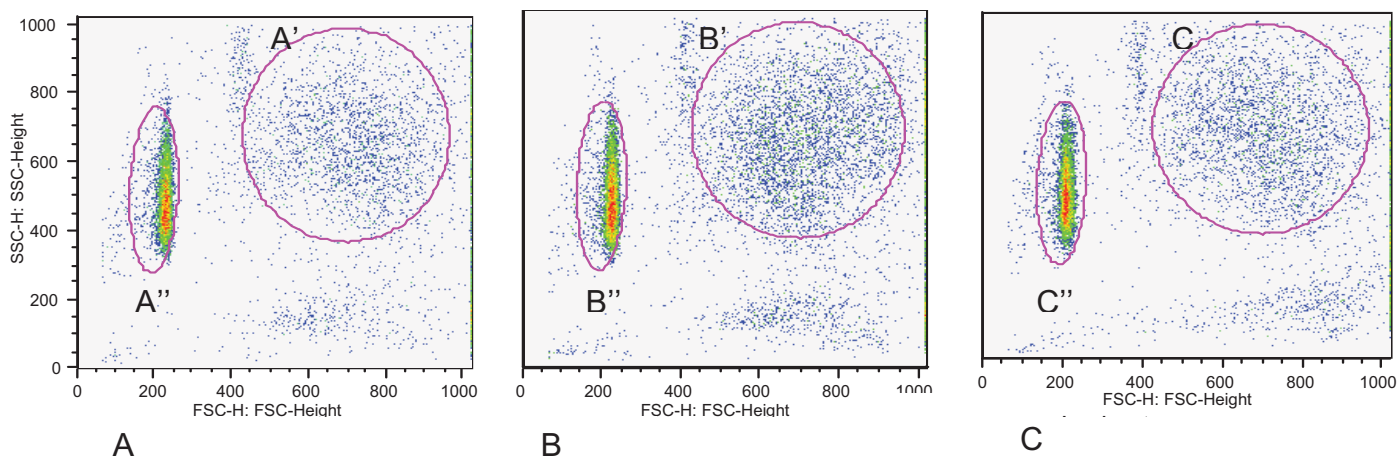


Figure 38 : Analyse de la diapédèse spontanée (A) ou dirigée (IL-8 recombinante humaine (B) ou sérum activé contenant du C5a (C))

Ensuite, pour les trois types d'échantillons (sans chimioattractant, avec IL-8, avec ZAS ; Figure 38), le nombre de neutrophiles présents est normalisé grâce au nombre de billes ajoutées dans l'échantillon *a posteriori*. Pour chaque prélèvement les neutrophiles sont identifiés par les critères de taille/granulosité des cellules (Figure 38 : cercles A', B', C'). Les billes sont repérables à gauche des cellules sur les quadrants (Figure 38 : A'', B'', C'').

Les résultats de diapédèse spontanée (rapport neutrophiles/billes) varient de 0.005 à 3.048 avec une moyenne de 1.009. Pour la diapédèse dirigée par l'IL-8, le rapport évolue de 0.45 à 3.12 avec une moyenne de 1.31. Enfin, les résultats de la diapédèse dirigée par le zymosan activé varient de 0.39 à 26.64 avec une moyenne de 6.53. L'effet chimioattractant semble donc plus fort pour le zymosan que pour l'IL-8 à la concentration utilisée.

a. Effets instantanés

L'analyse des corrélations entre la diapédèse et les valeurs instantanées de NH₃ et de l'urée montre qu'il existe une corrélation entre la valeur de NH₃ et la diapédèse spontanée des GNN (Diap Med = en l'absence de chimioattractant) ($p < 0,01$) (Figure 39) :

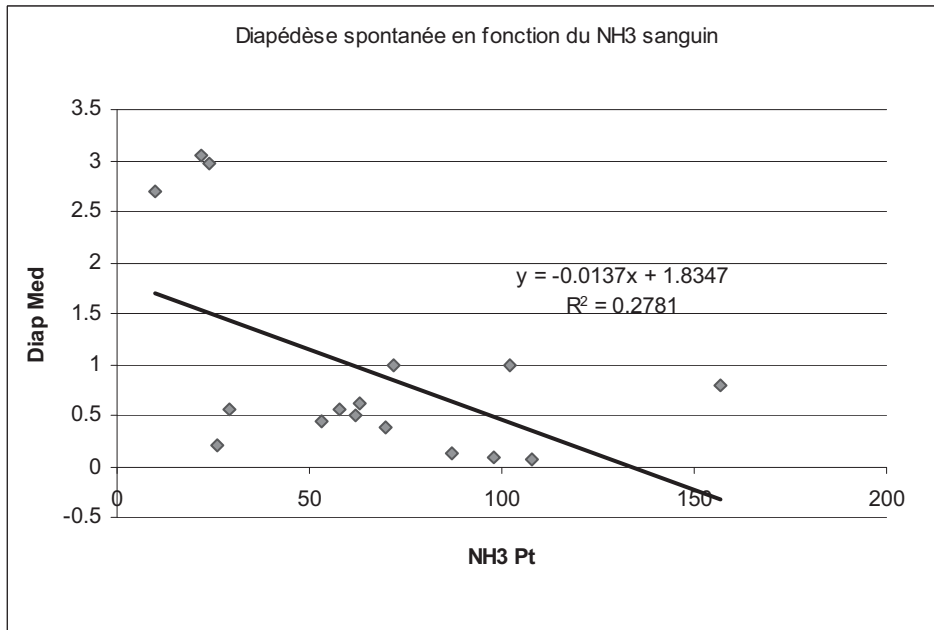


Figure 39 : Etude de la corrélation entre la diapédèse spontanée (DiapMed) et la valeur d'ammoniémie (Logiciel Excel®)

On constate que des valeurs croissantes d'ammoniémie entraînent une diminution des capacités de diapédèse spontanée des neutrophiles. Cependant, des effets Animal, Mois et des interactions Animal*NH3 et Mois*NH3 sont notés (Figure 40).

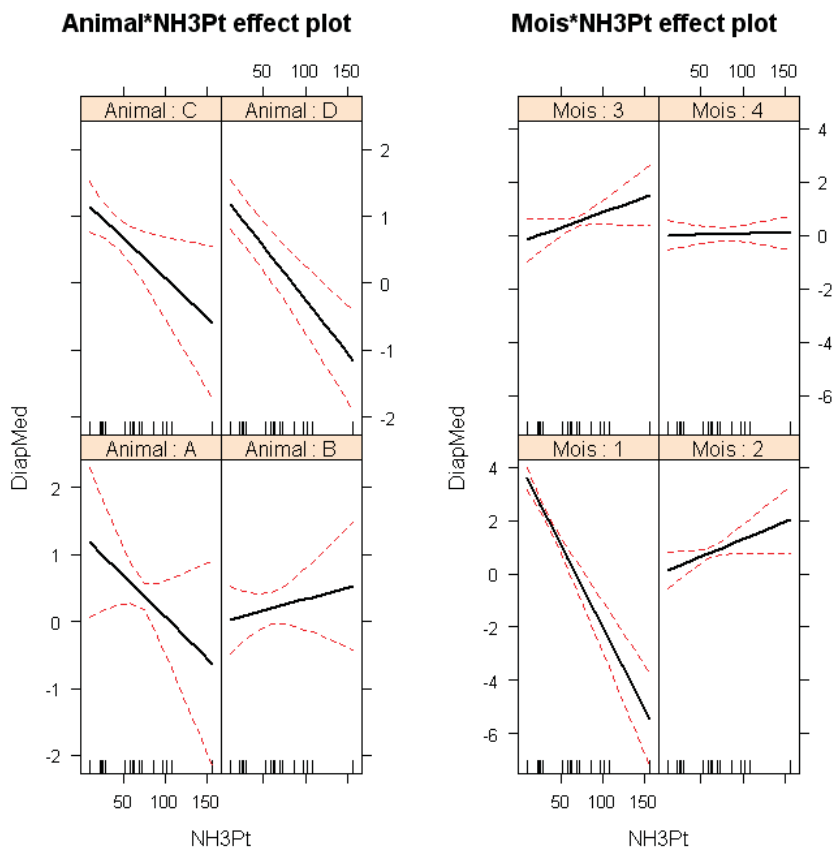


Figure 40 : Etude des corrélations entre l'ammoniémie et la diapédèse spontanée. Interactions Animal*NH3 et Mois NH3 (Logiciel R2.9.0®)

La diapédèse induite par les chimioattractants (IL-8, ZAS) n'est pas modifiée par les variations de l'urée ou de l'ammoniac sanguins.

b. Effets cumulatifs

En l'absence de chimioattractant (DiapMed), une corrélation entre les capacités de diapédèse et la glycémie est notée ($p < 0,05$). Pour des valeurs de glycémie croissantes, la capacité de diapédèse diminue (Figure 41).

On note aussi un effet du mois. ($p < 0,01$).

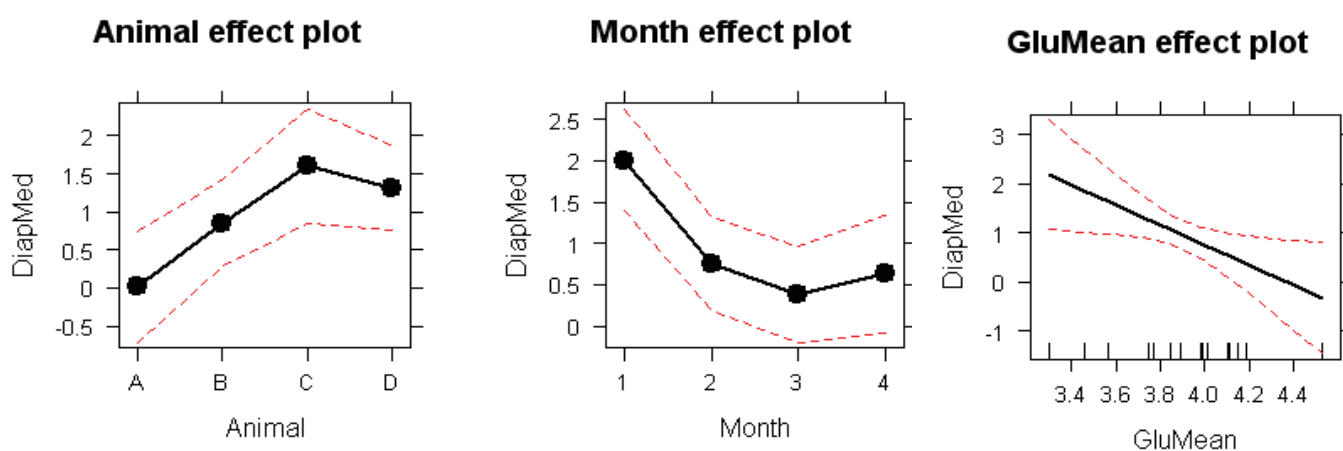


Figure 41 : Etude des capacités de diapédèse spontanée (DiapMed) en fonction du glucose. Effets Animal, Mois et Glucose (*Logiciel R2.9.0®*).

Alors qu'un effet du mois de prélèvement est également noté, une corrélation de la diapédèse non dirigée est aussi détectée avec la concentration sanguine de l'hormone T4. Toutefois, l'analyse des variations de T4 montre que le mois a un effet marqué sur la valeur de T4 (Figure 42).

On peut donc penser que

- les variations de diapédèse spontanée sont corrélées aux variations de T4
- les variations de T4 sont liées à des variations physiologiques au cours du temps et non à la ration.

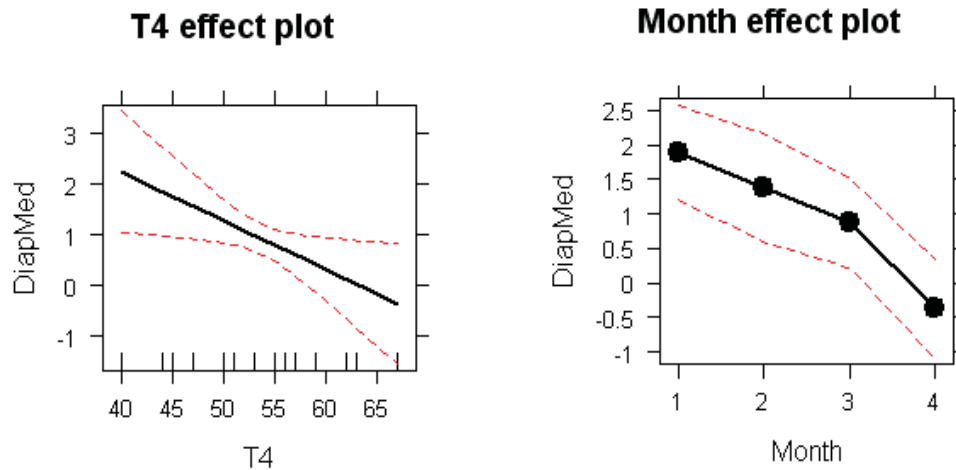


Figure 42 : Etude des capacités de diapédèse spontanée (DiapMed) en fonction de la T4. Effets Mois et T4 (*Logiciel R2.9.0®*).

La diapédèse stimulée par les chimioattractants n'est corrélée à aucun des paramètres biochimiques mesurés. Les autres modèles (effet ration et effet de la source azotée) ne permettent pas de mettre en évidence d'effet significatif.

4. Phagocytose

Pour analyser la phagocytose, deux paramètres ont été évalués par cytométrie de flux :

- Le pourcentage de neutrophiles marqués. Ceci traduit le nombre de GNN ayant phagocyté des levures.
- l'intensité de marquage. Ce paramètre traduit le nombre de particules de zymosan phagocytées par les neutrophiles.

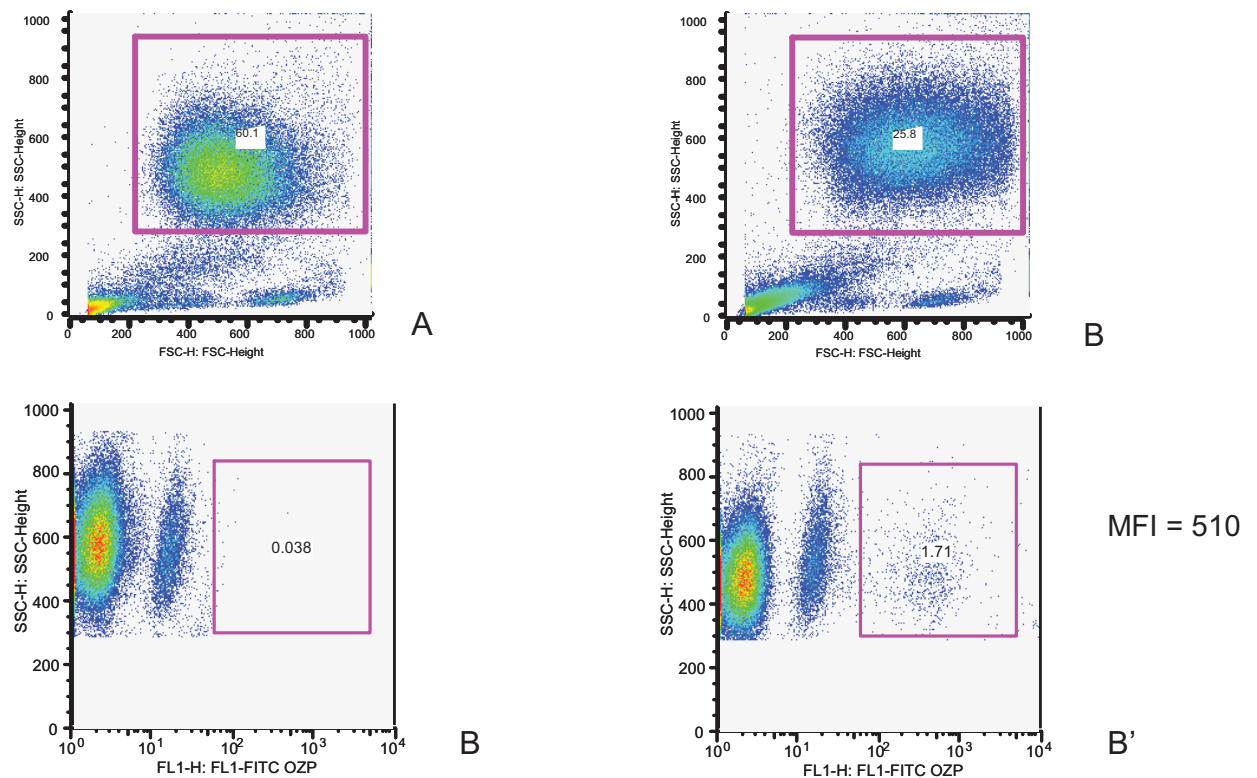


Figure 43 : Analyse de la phagocytose par cytométrie en flux. La première étape consiste à identifier la population cellulaire correspondant aux neutrophiles (A et B). L'analyse des neutrophiles ayant phagocyté des particules de zymosan non marquées (C) ou marquées par FITC-OZP (D) permet d'évaluer le nombre de cellules ayant phagocyté des levures. L'intensité moyenne de fluorescence est aussi enregistrée ; elle est proportionnelle au nombre de particules fluorescentes phagocytées par chaque cellule.

Les premières fenêtres graphiques (Figure 43) permettent de repérer la population neutrophilique ; l'analyse de la fluorescence due au FITC-OZP permet de comptabiliser le pourcentage de neutrophiles ayant phagocyté les levures. L'intensité moyenne de fluorescence permet d'évaluer le nombre de particules fluorescentes phagocytées par les cellules en moyenne. L'analyse de la fluorescence des neutrophiles incubés avec des levures non marquées (C) permet de fixer le seuil d'autofluorescence, la valeur obtenue pour les neutrophiles incubés avec les levures marquées (D). L'intensité de la fluorescence obtenue tous prélèvements confondus varie de 372 à 782 avec une moyenne de 524. Le pourcentage de neutrophiles ayant phagocyté varie de 1.43 à 3.61 avec une moyenne de 2.29 %.

a. Effets instantanés

Aucun effet de l'urée ou de l'ammoniac n'est détecté par le modèle sur les capacités de phagocytose des neutrophiles.

b. Effets cumulatifs

Une corrélation entre le pourcentage de GNN marqués et la T4 est notée ($p < 0,05$).

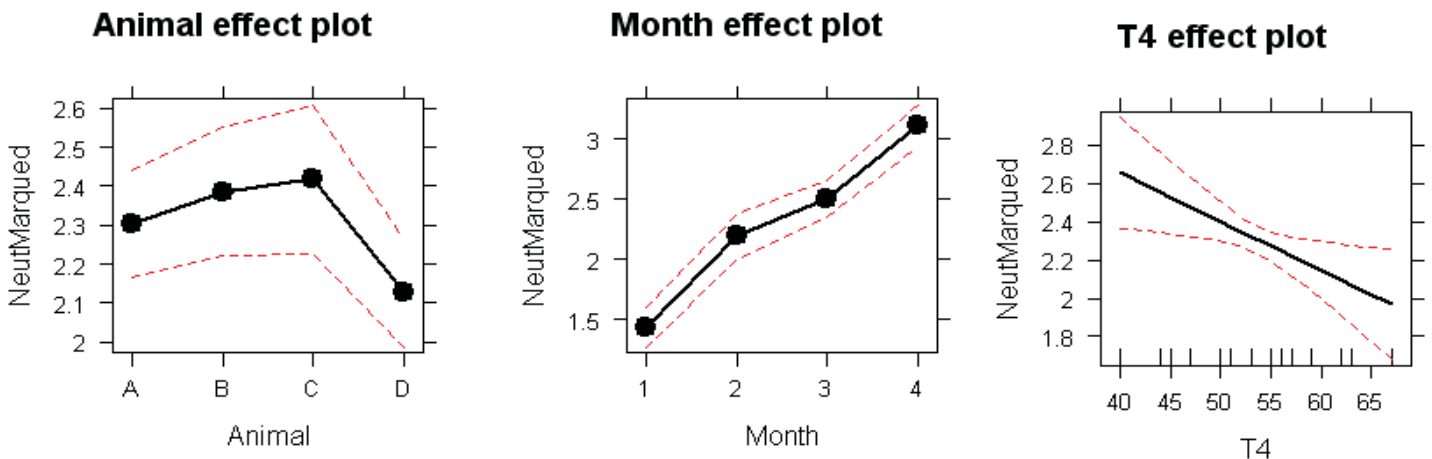


Figure 44 : Etude des capacités de phagocytose (% de neutrophiles ayant phagocyté NeutMarqued) en fonction de la T4. Effets Animal, Mois et T4 (*Logiciel R2.9.0®*).

Un fort effet Mois ($p < 0,001$) et Animal ($p < 0,05$) est aussi noté (Figure 44).

c. Autres modèles

L'analyse de l'effet de la ration sur le pourcentage de neutrophiles ayant phagocyté des particules montre un effet de la ration. Celui-ci n'est pas significatif ($p = 0,054$) mais une différence significative est cependant observée, notamment entre la ration à 16% MAT et la ration à 20% MAT préparée avec du soja. ($p < 0,05$) (Figure 45).

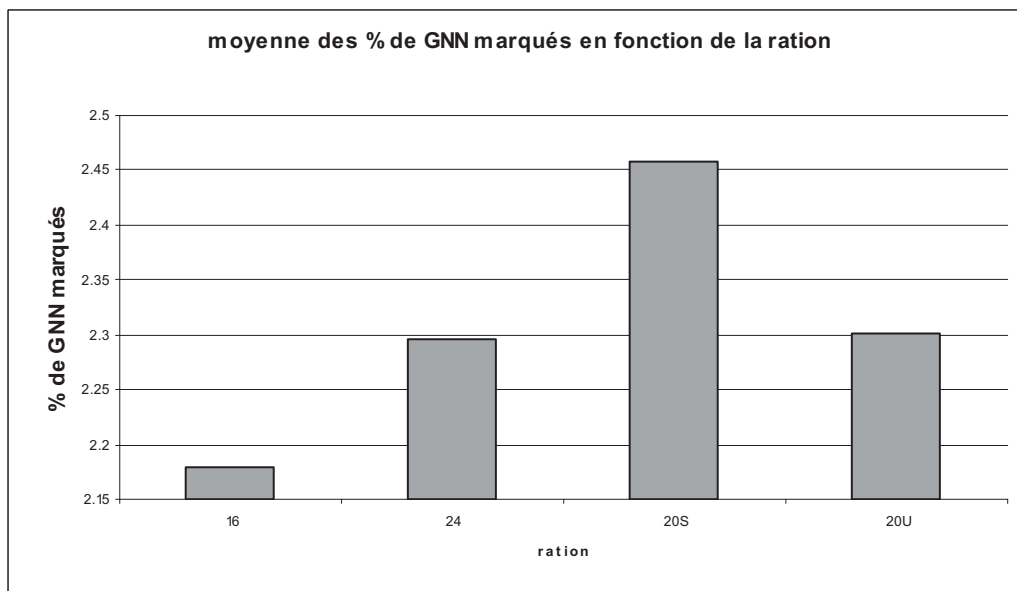


Figure 45 : Moyenne des pourcentages de neutrophiles ayant phagocyté en fonction de la ration ingérée.

Le modèle analysant l'effet de la source azotée

$$Y = \mu + An + Mois + Soja + Urée + Soja \times Urée + \varepsilon$$

montre un effet Soja ($p < 0,05$), ainsi qu'une interaction Soja*Urée sur le pourcentage de neutrophiles ayant phagocyté des particules.

5. Bactéricidie

Les propriétés bactéricides des neutrophiles sont évaluées par la mesure de la densité optique de l'échantillon incubé avec un réactif coloré, après incubation d'une quantité connue de bactéries et de neutrophiles. Les pourcentages de bactéricidie des neutrophiles sont compris entre 68.04 et 95.70%, la moyenne de tous les prélèvements étant de 79.21%.

Bien que le pourcentage de bactéricidie semble décroître lorsque le taux d'azote de la ration augmente, l'analyse statistique ne montre pas de corrélation avec les paramètres étudiés en raison des écarts-types trop grands (Figure 46).

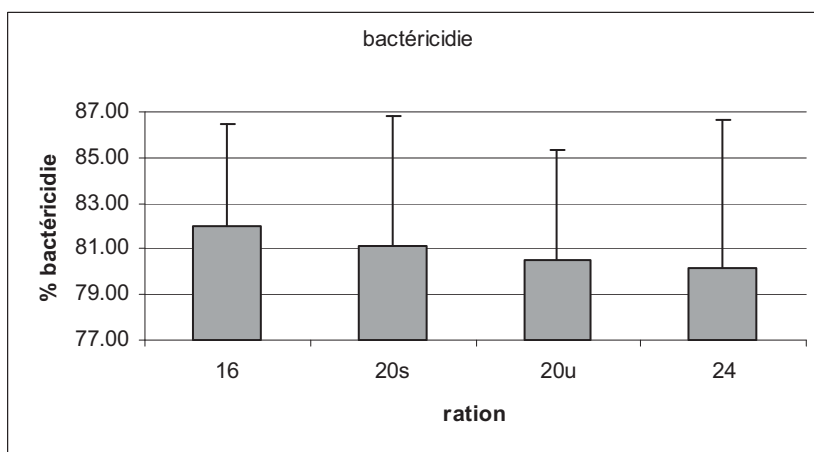


Figure 46 : Intensité de la bactéricidie en fonction de la ration

6. Bilan des effets

Le tableau 6 présente le bilan des effets qui ont été révélés par l'analyse statistique. Les fonctions des neutrophiles sont plus ou moins affectées par les variations des paramètres biochimiques. Ainsi, l'expression des L-sélectines et la diapédèse spontanée sont les fonctions qui sont le plus modifiées. L'urémie et l'ammoniémie, modifient respectivement l'expression de CD62L et la diapédèse spontanée des neutrophiles. En outre ces deux paramètres sont directement influencés par la teneur en azote de la ration.

Par ailleurs, le statut acido-basique sanguin (en relation avec les bicarbonates sanguins et le trou anionique) est aussi à l'origine d'une forte modification de l'expression de CD62L.

Tableau 6 : Corrélations révélées par l'analyse statistique. 0 = $p \sim 0.05$, 1 = $p < 0.05$, 2 = $p < 0.01$, 3 = $p < 0.001$.

	Pureté des neutrophiles	Expression de CD62L	Diapédèse spontanée	% phagocytose
<u>Effet instantané</u>				
NH3			2	
Urée		1		
<u>Effet cumulatif</u>				
Bica sg	2	1		
Cu	1			
AGNE		3		
glucose			1	
I	1			
T4			1	1
TA		3		

	% phagocytose	CD62L
<u>Effet ration</u>	0	
16% // 20% _s	1	
<u>Source de MAT</u>		
Soja	1	1
Soja * urée	1	

IV. Discussion

L'objectif de cette étude est de déterminer si un excès d'azote soluble, dans des proportions compatibles avec la réalité du rationnement des bovins, conduit à une modification des fonctions des neutrophiles chez les bovins. Il est en effet communément admis que lors de ration hyperazotée (ou lors de transitions alimentaires qui provoquent une augmentation de la part azotée de la ration, comme par exemple par la consommation d'herbe jeune au printemps), l'incidence des pathologies d'origine infectieuse augmente en relation avec une possible diminution de la résistance immunitaire des animaux. Cependant, l'effet de l'azote de la ration sur une diminution des fonctions immunitaires n'a jamais été formellement démontré. Les neutrophiles constituant un des premiers moyens de défense vis à vis des infections bactériennes, nous avons choisi d'évaluer leurs fonctions en considérant qu'elles pouvaient être modifiées et responsables des modifications de la capacité de réponse anti-infectieuse dans les conditions précédemment décrites.

Pour cette raison, nous avons étudié certaines fonctions des neutrophiles en relation avec les mécanismes de défense immunitaire. Pour cela, les fonctions des neutrophiles ont été évaluées *ex vivo* chez quatre bovins consommant quatre rations contenant des taux croissants d'azote soluble. Après purification, des mécanismes essentiels de la réponse de ces cellules à une infection bactérienne ont été testés (depuis la capacité d'adhésion à l'endothélium jusqu'à la phagocytose, qui sont détaillées dans ce document ; les capacités de production des radicaux libres et de la myéloperoxydase font l'objet d'une autre communication par *Millet 2010*).

Par ailleurs, les analyses biochimiques qui ont été réalisées en parallèle ont permis de rechercher des corrélations entre les paramètres biochimiques mesurés et les variations des fonctions neutrophiliques. Toutefois, l'exploitation de ces données est délicate, et il est nécessaire de rechercher auparavant l'effet des différentes rations sur les paramètres biochimiques ce qui est décrit dans le travail de *Ferraton (2010)*.

Les résultats obtenus suggèrent fortement que la quantité d'azote de la ration modifie certaines caractéristiques physiques et fonctionnelles des neutrophiles du

sang. Ces résultats rappellent ceux obtenus lors d'études de la réponse des neutrophiles chez la souris ou chez des patients atteints d'insuffisance rénale.

Une des limites de notre étude est le faible nombre de bovins étudiés. Comme les données présentées le montrent, nous avons observé de grandes variations d'un animal à l'autre. Ces variations sont quelquefois plus grandes que les variations provoquées par une modification de la ration ou entre les jours de la mesure. Il est cependant difficile d'inclure un grand nombre d'animaux dans une étude telle que celle que nous avons réalisée. Il est difficile d'augmenter au-delà le nombre de prélèvements et d'analyses à réaliser quotidiennement. Pour augmenter le nombre d'animaux évalués, il faudrait obligatoirement allonger la durée de l'étude en augmentant le nombre de jours de prélèvements et en constituant plusieurs groupes de même effectif que celui étudié ici. Le nombre maximal d'animaux évalués chaque jour est de l'ordre d'une dizaine pour deux personnes habituées à réaliser ces tests.

Un petit nombre d'animaux a été utilisé ici puisque l'étude repose sur quatre bovins seulement. Cependant, nous avons cherché à compenser le faible nombre d'animaux par le protocole expérimental et la méthode d'analyse statistique. En effet, l'utilisation d'un carré latin, où tous les individus reçoivent chaque ration à une période donnée, permet de mieux maîtriser l'effet animal dans la variation des résultats.

Le modèle statistique permet également de différencier les différents effets interférents tels que l'effet du Mois d'analyse, de la variabilité individuelle (effet Animal), et des interactions entre les paramètres étudiés.

D'autre part, nous pouvons nous interroger sur la représentativité et la pertinence de l'échantillon par rapport aux types de bovins et au stade physiologique concernés par cette étude. En effet, les troubles auxquels nous faisons référence précédemment, concernent essentiellement les vaches laitières en production. Le choix du type animal que nous avons fait permet cependant de s'affranchir des variations liées au cycle sexuel des vaches (et donc aux variations hormonales), et de l'effet du stade physiologique (gestation et/ou lactation). Par ailleurs, en utilisant des jeunes mâles castrés à l'entretien, la probabilité d'apparition d'affections d'origine infectieuse (notamment mammaires) au cours de l'étude de longue durée, est très réduite. Cependant, le métabolisme général d'un bovin à ce stade physiologique est

probablement assez différent de celui de la vache laitière en début de lactation, en particulier le volume d'ingestion, le métabolisme hépatique notamment.

Les cellules ont été purifiées à partir du sang récolté après ponction veineuse à la veine jugulaire. Ces prélèvements ont été répétés tous les jours pendant une durée d'une semaine. La répétition des interventions sur l'animal pourrait constituer un stress à l'origine d'une modification de la numération et de la formule sanguine. Cependant, les boeufs, nés et élevés sur le site de l'école vétérinaire, sont très habitués au contact avec l'homme et ont l'habitude d'être manipulés. De ce fait, les prélèvements ont pu être réalisés facilement sans agitation. Ceci est très important pour éviter une augmentation de la cortisolémie et les modifications de la formule sanguine associées à un évènement stressant.

La méthode de purification des cellules est également importante pour l'obtention de résultats pertinents. En effet, il est primordial que l'échantillon sur lequel les tests fonctionnels sont réalisés, ne contienne qu'un seul type de cellules (des neutrophiles). Par ailleurs, la méthode de purification ne doit en aucun cas interférer avec les capacités de réponse ou l'état d'activation des neutrophiles. En effet, les neutrophiles peuvent être activés lors de l'étape de purification, modifiant alors la capacité de réponse et modifiant l'expression des antigènes de surface (*Watson 1992, Macey 1992*). Le chimiotactisme, et en conséquence la capacité de diapédèse, peuvent aussi être inhibés par les procédures d'isolement (*Glasser 1990*). La méthode utilisée dans notre étude permet d'optimiser la pureté cellulaire, le rendement, la viabilité des neutrophiles et ne modifie pas la réponse des cellules aux stimuli utilisés.

Le modèle d'étude que nous avons choisi, à savoir l'étude *ex-vivo* des neutrophiles prélevés chez des bovins consommant des rations dont la quantité et la nature de l'azote soluble varient, permet d'étudier les conséquences de ces différentes rations sur les neutrophiles. Cependant, cette approche possède des limites. En effet, il existe un grand nombre de facteurs susceptibles de modifier le résultat des tests depuis l'animal jusqu'à la réalisation du test lui-même. Les cellules sanguines sont exposées à un grand nombre de produits du métabolisme dont les taux varient assez fortement au cours du temps. Le modèle statistique permet de rechercher des corrélations entre les diverses fonctions des neutrophiles et les

paramètres mesurés, mais aussi entre les paramètres et les quatre types de rations, et en dernier lieu entre les rations et les fonctions neutrophiliques.

Cependant, lorsqu'un paramètre est corrélé avec une variation d'une activité neutrophilique, il est nécessaire de rechercher l'origine de la variation de ce paramètre. En effet, le paramètre peut varier à cause de la ration elle-même, ou évoluer pour d'autres raisons au cours du temps.

D'autre part, l'interprétation de ces corrélations et l'identification des facteurs causaux n'est pas forcément chose facile, et la question se pose de la transposition des résultats obtenus à une situation *in vivo*.

En outre, les cellules que nous avons étudiées sont des neutrophiles sanguins. Or, lors de la pénétration d'un agent pathogène, les neutrophiles agissent au site de l'infection qui se situe le plus souvent dans les tissus. Les étapes qui vont permettre à terme l'élimination de l'agent pathogène sont nombreuses (adhésion endothéliale, diapédèse, chimiotactisme...) et il est possible que les déficits cumulés conduisent à un déficit plus marqué de la réponse neutrophilique, que celle que l'on peut estimer par l'évaluation de chaque étape prise séparément. En outre il est difficile d'affirmer que les capacités fonctionnelles – celles d'éliminer l'agent infectieux - sont les mêmes entre les neutrophiles sanguins et ceux qui se localisent dans les tissus. Cependant certaines études ont montré qu'il existait une assez bonne corrélation pour certaines mesures ; pour d'autres, cette corrélation est plus faible, voire nulle. Selon *Burvenich (et al. 2002)*, les neutrophiles présents dans le lait ont une chimioluminescence inférieure aux neutrophiles sanguins après stimulation par le PMA. Cette diminution d'activité semble essentiellement liée à l'ingestion de globules gras et de micelles de caséine. Cependant, la diapédèse pourrait aussi être à l'origine d'une modification de l'activité des neutrophiles. *Smits (1999)* a montré que la diapédèse des neutrophiles *in vitro* provoque une diminution de la phagocytose et de l'explosion respiratoire. D'autre part, elle peut aussi entraîner une augmentation de l'apoptose des neutrophiles (*Van Oostveldt 2002*).

Lors d'infection bactérienne, la phase d'inflammation aiguë est à l'origine d'une libération de cytokines (TNF, interférons, interleukines). Il a été montré que ces cytokines sont à l'origine d'une augmentation de l'adhésion, de la phagocytose et de la bactéricidie, ainsi que d'une diminution de la diapédèse (*Smits 1998*).

L'effet de l'urée sur les fonctions des neutrophiles n'est pas clairement démontré dans notre étude. Néanmoins, une corrélation est détectée entre l'urémie et l'expression des L-sélectines à la surface des neutrophiles. Les concentrations croissantes d'urée plasmatique sont corrélées à une augmentation de l'expression des L-sélectines ; un effet du soja est également noté sur l'expression de ce récepteur membranaire.

Pourtant, nous pouvons nous interroger sur les relations de causalité. L'étude statistique ne permet pas d'affirmer que l'augmentation de l'urémie est, à elle seule, à l'origine de l'augmentation de l'expression des L-sélectines. Toutefois, ces deux paramètres évoluent de la même manière en réponse à des excès d'azote soluble. Une corrélation entre la ration et l'urémie est d'ailleurs détectée ($p < 0.01$) ainsi qu'un effet de la nature de la source azotée ($p < 0.05$).

Dans une étude réalisée chez la souris, *Zarbock et al. (2006)* ont montré que l'expression des L-sélectines est diminuée à la surface de neutrophiles prélevés chez des souris urémiques comparativement à ceux prélevés chez des souris saines.

Chez des enfants atteints de syndrome hémolytique et urémique, l'expression de FcγRIII (CD16) et de CD11b est diminuée par rapport aux enfants sains (*Fernandez et al. 2002*). Ces résultats sont cependant obtenus à partir de neutrophiles ayant été exposés à des concentrations très élevées d'urée (jusqu'à 46 mmol/L) ; notre étude ne confirme pas ces résultats aux concentrations d'urée plasmatique mesurées dans l'étude (moyenne de 6.88 mmol/L [2.9 à 9.2 mmol/L]), qui sont dans l'intervalle usuel de l'urémie [2.1 – 7.9 mmol/L] ou très légèrement supérieurs.

Par ailleurs, nous n'avons pas constaté de lien entre l'urée de la ration et la phagocytose. Chez des patients sous hémodialyse, les capacités de phagocytose des neutrophiles ne sont pas modifiées par l'urémie (*Anding et al. 2003*), mais les capacités bactéricides semblent être diminuées probablement à cause d'une altération des granules spécifiques des neutrophiles.

Cependant, il faut noter que certaines membranes de dialyse activent le complément et peuvent diminuer les fonctions de phagocytose. Le temps de dialyse des patients modifie aussi ces fonctions. L'utilisation de membranes bio-compatibles permet dans l'étude citée de réduire les possibles modifications des fonctions neutrophiliques.

Par ailleurs, le taux d'apoptose des neutrophiles mesuré chez des patients atteints d'insuffisance rénale chronique est supérieur à celui des individus sains (*Sardenberg et al. 2006*). Le rôle de l'urée et des toxines présentes dans le plasma des patients est suspecté. *Jaber et al. (2001)* ont montré l'implication des protéines Fas dans l'apoptose des neutrophiles exposés à l'urée. En effet, les neutrophiles expriment à leur membrane la protéine Fas qui interagit avec son ligand (**Fas-L**) sécrété par les cellules polynucléaires. La protéine agit de manière autocrine ou paracrine et elle est à l'origine du processus de mort cellulaire programmée. Ils ont montré que l'expression de Fas est augmentée chez les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique et que le sérum urémique augmente l'expression des protéines Fas et Fas-L. Nous n'avons pas mesuré l'expression de ces molécules dans la situation étudiée, mais c'est un paramètre qu'il serait intéressant d'analyser dans les prochaines études sur l'interaction azote de la ration et fonctions neutrophiliques.

D'autres toxines sont mises en cause dans les situations urémiques. *Ottonello et al. (2004)* ont montré que les leptines inhibent la migration des neutrophiles humains *in vitro*. La leptine est une hormone produite par le tissu adipeux en fonction de la taille des adipocytes et/ou de la quantité de lipides corporels. Ainsi, la quantité de leptines de l'animal est fonction à long terme de l'adiposité de l'organisme. A plus court terme, la concentration de leptine diminue en réponse à un déficit énergétique.

La leptine est donc, entre autre, au centre de l'homéostasie énergétique. Elle permet d'informer le système nerveux central sur l'état des réserves adipeuses et elle est aussi le témoin de la balance énergétique. Elle participe à la régulation de la masse corporelle, via des récepteurs centraux et périphériques, en diminuant la prise alimentaire et en augmentant les dépenses énergétiques.

D'autre part, il semble que les leptines jouent aussi un rôle important dans l'immunité (régulation de la réponse des lymphocytes T, augmentation de la production de TNF- α ... (*Ottonello 2004*)). L'hypoleptinémie associée aux états d'inanition est étroitement liée à une augmentation de la sensibilité aux infections à cause de la malnutrition. Cependant, des niveaux de leptines élevés peuvent aussi être associés à une susceptibilité accrue aux infections. Le sérum de patients en phase terminale de maladie rénale inhibe la migration des neutrophiles en réponse au f-MLP, et une stricte corrélation est établie entre le taux de leptines et la capacité du sérum à inhiber la migration (*Ottonello 2004*). D'autres études ont aussi montré que le chimiotactisme et la production de radicaux libres des neutrophiles humains sont modifiés par le taux

de leptines. Toutefois, des études menées sur des neutrophiles bovins (*Ahmed 2007*) ont montré que les leptines (d'origine humaine) n'ont pas d'effet sur la production d'ions superoxyde, ni sur la dégranulation *in vitro*.

La diapédèse spontanée des neutrophiles à travers la membrane Transwell® semble inversement proportionnelle à l'ammoniémie. L'effet délétère de l'ammoniac a aussi été observé par *Murata et Horino (1999)*. L'exposition de neutrophiles et de macrophages bovins prélevés par lavage broncho-alvéolaire à des concentrations élevées d'ammoniac atmosphérique semble inhiber les fonctions de ces cellules (chimiotactisme, phagocytose, dégranulation et bactéricidie).

Il est donc probable que l'urée et l'ammoniac ont des effets délétères directs sur les fonctions neutrophiliques. Cependant, diverses toxines sont également susceptibles d'intervenir dans les mécanismes à l'origine de la diminution des fonctions, avec possiblement des conséquences sur les capacités de défense immunitaire des organismes.

Les taux d'azote soluble des rations peuvent aussi agir indirectement en modifiant les équilibres métaboliques et hydro-minéraux. En effet, il semble que les bicarbonates soient associés à une diminution d'expression des L-sélectines. Cependant, aucun effet des rations n'est observé sur les valeurs de bicarbonatémie. Toutefois, même si les corrélations ne sont pas détectées ici, il a été montré que lors d'intoxication aiguë au tourteau de soja, la bicarbonatémie augmente significativement en relation avec l'alcalose métabolique (*Ferrières 2009*). L'étude statistique montre aussi une corrélation entre le trou anionique - $TA = ([Na^+] + [K^+]) - ([Cl^-] + [HCO_3^-])$ correspond à la différence entre les cations mesurés (95 % des cations plasmatiques totaux) et les anions mesurés (85 % des anions plasmatiques totaux) (*Navetat, 1999*) - et l'expression de CD62L. En effet, plus le trou anionique est élevé, plus l'expression de CD62L est forte. Ceci est cohérent avec les résultats précédents. En effet, le trou anionique est directement dépendant de la concentration en anions sanguins et plus précisément de la bicarbonatémie. Ces corrélations montrent la complexité de la recherche des effets des paramètres en cause. Ces derniers sont interdépendants ; ici la bicarbonatémie peut agir directement sur l'activité des neutrophiles. Cependant, elle reflète aussi l'alcalose métabolique lors d'intoxication à l'azote soluble ; il est donc

difficile de savoir si l'alcalose agit via les bicarbonates ou via d'autres molécules (comme l'urée, l'ammoniac...) sur les fonctions neutrophiliques

D'autre part, l'expression des L-sélectines est corrélée positivement avec la concentration en acides gras non estérifiés. On peut penser que par conséquent l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium vasculaire est augmentée dans ce cas. L'effet pro-inflammatoire des acides gras a déjà été montré (*Bates 1992*) ; cette étude a montré que l'expression de CD11b est augmentée par les acides gras 20 :4 (acide arachidonique), 20 :5 et 22 :6. Ces acides gras stimulent aussi l'adhésion des neutrophiles *in vitro*. *Naccache (1984)* a aussi montré l'effet des acides gras libres (dont l'acide arachidonique) sur les neutrophiles : ceux-ci induisent l'agrégation et la dégranulation des neutrophiles. Il a aussi montré que l'acide arachidonique (ainsi que certains acides gras *cis* insaturés) inhibe la réponse des neutrophiles au peptide fMLP. Toutefois, certains acides gras pourraient inhiber ces réponses. La production de radicaux libres est augmentée par les acides gras (*Badwey 1984, Scalia 2006*). Des changements de la morphologie des cellules et une diminution de la viabilité sont associés à une concentration élevée d'AGNE. Par contre, la phagocytose et l'apoptose ne semblent pas affectés par ces métabolites.

La glycémie est corrélée à la faculté de diapédèse spontanée des neutrophiles. Pour des valeurs de glycémies élevées, celle-ci semble diminuée. Aux concentrations d'azote soluble mesurées dans notre étude, aucune relation entre la glycémie et les autres paramètres biochimiques, et aucun effet des différentes rations sur la glycémie n'ont été notés. Pourtant, il semble qu'une hyperglycémie soit observée lors d'hyperammoniémie. Lors d'intoxication à l'azote soluble, un pic d'hyperammoniémie est corrélé à une augmentation significative de la glycémie (*Ferrières 2009*). Cette hyperglycémie a été identifiée chez des brebis intoxiquées avec de l'urée (*Emmanuel 1981 et 1982 ; Fernandez 1988*). L'origine de l'hyperglycémie est une diminution de la sécrétion d'insuline par l'ammoniac via une action directe sur les cellules β du pancréas (*Vissek, 1984*).

Par ailleurs, l'étude statistique montre un effet instantané de NH_3 sur la diapédèse spontanée des neutrophiles. Les valeurs croissantes d'ammoniémie sont corrélées à une diminution de la diapédèse spontanée. Ceci est en accord avec les résultats concernant les valeurs de glycémie. En effet, les valeurs élevées de glycémie sont

aussi corrélées à une diminution de la diapédèse spontanée des neutrophiles. Cependant, l'augmentation de la glycémie est très faible au cours des cinétiques journalières que nous avons réalisées, probablement parce que la quantité d'azote soluble ingéré n'est pas assez grande pour produire une élévation significative.

Les taux d'hormone thyroïdienne (T4) semblent corrélés aux fonctions de diapédèse et de phagocytose des neutrophiles. Des taux plus élevés de cette hormone sont associés à une diminution de ces deux fonctions. *Arerugi (1992)* a aussi montré que les taux élevés d'hormone thyroïdienne ont des effets négatifs sur les fonctions neutrophiliques. En effet, la production de radicaux libres est exacerbée lorsque les neutrophiles (de même que les macrophages) sont incubés en présence d'hormone thyroïdienne et ceci semble être à l'origine de pathologies (comme l'asthme) chez des patients atteints d'hyperthyroïdisme.

L'analyse de la dégranulation (mesurée par chémioluminescence) et de la production de myéloperoxydase réalisée par *Millet (2010)* en parallèle de notre étude a été analysée après deux types de stimulation. La stimulation des neutrophiles par du zymosan activé induit la production de radicaux libres par le neutrophile à partir de l'engagement de récepteurs membranaires comme le récepteur au fragment Fc et le récepteur TLR2, et de la phagocytose. Le PMA au contraire agit directement sur la PKC qui active en cascade la NADPH oxydase (Figure 47).

Plusieurs effets corrélés ont ainsi été démontrés. En résumé, la ration a un effet significatif sur la production de radicaux libres après stimulation par le zymosan oponsé. Dans les rations à teneur élevée en azote, la chimioluminescence est réduite par rapport à la ration à 16% MAT. Au niveau biochimique, l'urée et l'ammoniac ont des effets négatifs sur la chimioluminescence après stimulation par le zymosan. Plus leur concentration augmente, moins la CL est forte. Par contre, aucune relation n'est établie entre les paramètres biochimiques et la valeur de CL après stimulation par le PMA, indiquant que les événements situés juste après l'engagement des récepteurs et la phagocytose sont responsables de la différence observée. La quantité de MPO libérée n'est par contre pas modifiée par les variations des paramètres biochimiques.

Les effets des paramètres biochimiques semblent donc avoir surtout une influence sur la production de radicaux libres. Il semblerait qu'ils influent sur la cascade d'activation située entre le premier contact et la phagocytose, et l'activation de la NAPDHoxydase.

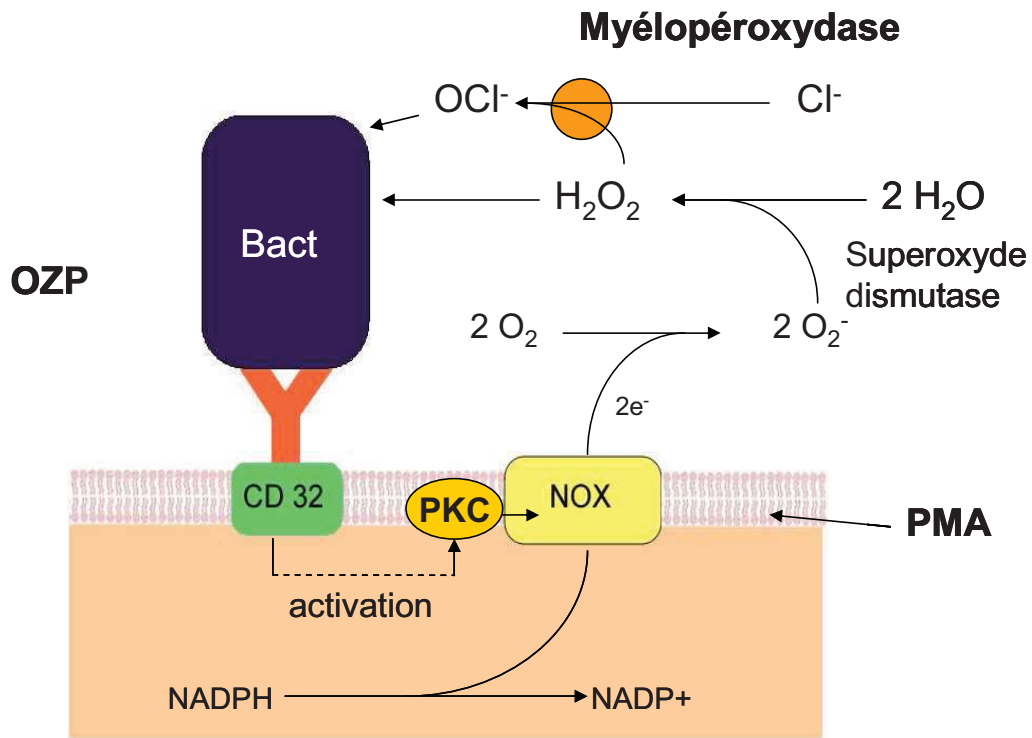


Figure 47 : Voies d'activation des neutrophiles et production de radicaux

Certaines étapes de la réponse anti-bactérienne, qui sont analysées dans cette étude sont donc modifiées par les excès azotés de la ration. Différentes corrélations ont été observées entre les paramètres biochimiques et les fonctions neutrophiliques. Principalement, la diapédèse spontanée diminue avec l'augmentation de l'ammoniémie, et l'expression des L-sélectines augmente en association avec des taux élevés d'urée. La phagocytose semble moins affectée par les variations des paramètres biochimiques (une seule corrélation est établie avec la concentration en hormone thyroïdienne T4).

V. Conclusion

Les résultats de cette étude suggèrent fortement que l'hypothèse que nous avons faite, à savoir que les excès d'azote modifient la réponse des neutrophiles, est vérifiée. Diverses corrélations ont ainsi pu être établies : effet délétère de l'ammoniac sur les capacités de diapédèse spontanée des neutrophiles, surexpression des L-sélectines associée à des taux élevés d'urée.

Toutefois, les modifications observées prises indépendamment ne sont probablement pas suffisantes pour expliquer une baisse d'immunité. Certaines analyses réalisées dans la même étude ont par ailleurs mis en évidence une diminution de la production de radicaux libres lors d'excès azotés. Ensemble, ces modifications peuvent conduire à une diminution significative des défenses anti-microbiennes supportées par les neutrophiles.

Nous pouvons donc conclure que les excès d'azote soluble sont susceptibles de conduire à une altération de l'immunité des animaux en agissant majoritairement sur la production de radicaux libres (*Millet 2010*) et seulement dans une moindre mesure sur les étapes précédant l'élimination des agents pathogènes (attachement, diapédèse, phagocytose).

Annexes

1. Calcul des rations (Larelev®, ENVT)

Ration 16% MAT

Ration quotidienne

Luzerne DH	(kg)	13.00
Maïs	(kg)	1.80
Tourteau de soja 48	(kg)	0.400
Urée	(kg)	0.00
AMV 15/11/6	(kg)	0.100

Contraintes calculées

	Valeur	Apport recommandé			Production correspond.
		Optimum	Minimum	Maximum	
MS totale (kg)	13.84				
Concentrés (% MS)	13.78				
Matière Brute (kg)	15.30				
MS (%)	90.45				
UEB	11.98	12.56	12.56	12.56	
UFV	9.14	9.76	9.76	10.73	788.50
UFV (/ kg MS)	0.661				
PDIE (g)	1343.50	885.93	885.93		non calc.
PDIN (g)	1461.60			1328.20	
(PDIE - PDIN) / UFV	-12.91	0.00		22.50	
PDIE (g/ kg MS)	97.08				
PDIN (g/ kg MS)	105.62				
Matières Azotées Totales (% MS)	16.04				
Cellulose Brute (% MS)	26.77		10.00		
ADF (% MS)	30.52				
Amidon + Sucres (% MS)	12.06				
Ca (g)	261.69		62.50		non calc.
P (g)	48.68		38.08		non calc.
P abs. Rts (g)	34.82		18.39		non calc.
Magnésium ajouté (g/ kg MS)	0.434		0.500		

Ration 20% MAT / soja

Ration quotidienne

Luzerne DH	(kg)	13.00
Maïs	(kg)	0.300
Tourteau de soja 48	(kg)	1.90
Urée	(kg)	0.00
AMV 15/11/6	(kg)	0.100

Contraintes calculées

	Valeur	Apport recommandé			Production correspond.
		Optimum	Minimum	Maximum	
MS totale (kg)	13.86				
Concentrés (% MS)	13.91				
Matière Brute (kg)	15.30				
MS (%)	90.59				
UEB	12.00	12.56	12.56	12.56	
UFV	9.13	9.76	9.76	10.73	785.71
UFV (/ kg MS)	0.659				
PDIE (g)	1561.00	885.93	885.93		non calc.
PDIN (g)	1862.10			1328.20	
(PDIE - PDIN) / UFV	-32.98	0.00		22.50	
PDIE (g/ kg MS)	112.63				
PDIN (g/ kg MS)	134.36				
Matières Azotées Totales (% MS)	20.05				
Cellulose Brute (% MS)	27.14		10.00		
ADF (% MS)	30.99				
Amidon + Sucres (% MS)	5.83				
Ca (g)	266.19		62.50		non calc.
P (g)	54.08		38.08		non calc.
P abs. Rts (g)	38.57		18.41		non calc.
Magnésium ajouté (g/ kg MS)	0.433		0.500		

Ration 20% MAT / urée

Ration quotidienne

Luzerne DH	(kg)	13.00
Maïs	(kg)	1.80
Tourteau de soja 48	(kg)	0.400
Urée	(kg)	0.210
AMV 15/11/6	(kg)	0.100

Contraintes calculées

	Valeur	Apport recommandé			Production correspond.
		Optimum	Minimum	Maximum	
MS totale (kg)	14.05				
Concentrés (% MS)	15.04				
Matière Brute (kg)	15.51				
MS (%)	90.55				
UEB	11.97	12.56	12.56	12.56	
UFV	9.14	9.76	9.76	10.73	788.50
UFV (/ kg MS)	0.651				
PDIE (g)	1343.50	885.93	885.93		non calc.
PDIN (g)	1764.60			1328.20	
(PDIE - PDIN) / UFV	-46.05	0.00		22.50	
PDIE (g/ kg MS)	95.66				
PDIN (g/ kg MS)	125.64				
Matières Azotées Totales (% MS)	20.02				
Cellulose Brute (% MS)	26.38		10.00		
ADF (% MS)	30.08				
Amidon + Sucres (% MS)	11.88				
Ca (g)	261.69		62.50		non calc.
P (g)	48.68		38.08		non calc.
P abs. Rts (g)	34.82		18.57		non calc.
Magnésium ajouté (g/ kg MS)	0.427		0.500		

Ration 24% MAT / soja + urée

Ration quotidienne

Luzerne DH	(kg)	13.00
Maïs	(kg)	0.300
Tourteau de soja 48	(kg)	1.90
Urée	(kg)	0.210
AMV 15/11/6	(kg)	0.100

Contraintes calculées

	Valeur	Apport recommandé			Production correspond.
		Optimum	Minimum	Maximum	
MS totale (kg)	14.07				
Concentrés (% MS)	15.17				
Matière Brute (kg)	15.51				
MS (%)	90.69				
UEB	11.98	12.56	12.56	12.56	
UFV	9.13	9.76	9.76	10.73	785.71
UFV (/ kg MS)	0.649				
PDIE (g)	1561.00	885.93	885.93		non calc.
PDIN (g)	2165.10			1328.20	
(PDIE - PDIN) / UFV	-66.17	0.00		22.50	
PDIE (g/ kg MS)	110.98				
PDIN (g/ kg MS)	153.93				
Matières Azotées Totales (% MS)	23.96				
Cellulose Brute (% MS)	26.74		10.00		
ADF (% MS)	30.53				
Amidon + Sucres (% MS)	5.74				
Ca (g)	266.19		62.50		non calc.
P (g)	54.08		38.08		non calc.
P abs. Rts (g)	38.57		18.58		non calc.

2. Protocole de purification des neutrophiles

Centrifuger les tubes à 1000g, 20 min.

Prélever le plasma et le stocker dans 2 tubes Falcon 15ml (2x10ml)

Prélever le buffy coat pour la préparation des PBMC.

Ajouter 2 volumes de NaCl 0,2% sur la glace, et agiter par retournement.

Après 45 secondes exactement, ajouter 0,5 volume de NaCl 3,7%

Centrifuger à 500g, 2 min à 4°C, et laver 2x avec HBSS sans Ca, Mg en centrifugeant 1 min à +4°C.

Répéter l'étape de lyse si nécessaire.

Compter les cellules et ajuster la concentration à $5 \cdot 10^6$ cell/ml.

Garder les cellules sur la glace.

3. Expression des marqueurs de surface. Protocole expérimental.

Réactifs :

Tubes FACS

Tampon FACS : PBS/BSA 1% / EDTA 2,5mM

Anti-CD11b A647 (AbD Sérotec); 1:500 soit 0,2 µg/ml

Anti-CD62L FITC (AbD Sérotec); 1:500 soit 1 µg/ml

Préparation des dilutions indépendantes d'anticorps en début de semaine de prélèvement et conservation à +4°C.

Les analyses sont réalisées en triplicate.

Placer 100µl de suspension cellulaire ($5 \cdot 10^6$ cellules/ml) dans chaque tube.

Ajouter 100µl de chaque anticorps par tube. Trois tubes servent de contrôle : l'un contient seulement des cellules, les deux autres contiennent les cellules et un seul type d'anticorps.

Incuber à +4°C pendant 30min.

Laver 2 fois (500g, 5min) avec du tampon FACS

Reprendre dans 400µl de tampon FACS.

4. Test de diapédèse. Protocole expérimental

Matériel et réactif

Plaque 24-puits et Transwell

RhIL-8 (R&D)

ZAS 20%

Diluer 2ml de ZAS dans 8ml de HBSS

HBSS 0.1% BSA

Ajouter 1.5 ml de solution contenant l'agoniste chimioattractant par puits.

Ajouter 0.5ml de suspension cellulaire à 1.10^6 cell / ml dans le puits supérieur.

Incuber 30min à 37°C.

Ajouter 10µl de billes fluorescentes et 10µl de marqueur fluorescent dans le puits inférieur.

Incuber 10min à température ambiante.

Collecter le contenu du puits dans un tube FACS, centrifuger 3 min à 400g.

Analyser par FACS.

5. Test de phagocytose. Protocole expérimental

Préparation de FITC-OZP

Peser 100 mg de Zymosan (SIGMA), et les reprendre dans 5ml de HBSS.

Bouillir à 95°C pendant 20min.

Soniquer pendant 20 secondes à une amplitude de 11µm.

Laver 2x avec HBSS puis centrifuger à 400g pendant 10 min.

Reprendre dans 5 ml de tampon carbonate 0,1M.

Ajouter 5 µl de FITC, 5 mg/ml.

Incuber 30 min à 37°C.

Laver 2x en tampon carbonate, puis 2x en HBSS.

Opsoniser le NOZ.

Reprendre le NOZ dans 5 ml de sérum bovin 65%, HBSS 35%

Incuber 1h à 37°C

Laver 2x en HBSS, centrifugation 400g pendant 10 min.

Reprendre dans 5 ml HBSS ; concentration finale : 20 mg/ml

Aliquoter.

Test de phagocytose

Diluer le FITC-OZP au 1 :20 (50 µl de FITC-OZP dans 950 µl de HBSS)

Prévoir deux tubes FACS par animal.

Placer 400µl HBSS dans un tube FACS.

Ajouter 50µl de FITC-OZP dans le premier tube, et 50µl de OZP non marqué dans le second tube de chaque animal.

Placer les tubes à 37°C pendant 30min jusqu'au dépôt des cellules.

Ajouter 50µl de suspension cellulaire à $5 \cdot 10^6$ cell/ml dans tous les tubes.

Incuber à 37°C pendant 1h.

Placer les tubes immédiatement sur la glace et analyser au FACS.

6. Test de bactéricidie. Protocole expérimental.

Réactifs

Staphylococcus aureus, [1.10^{10} bact/ml], -80°C

A diluer au 1/100 dans RPMI / 10% FBS ; faire une titration 90%

Saponin 2% PBS, filtrée 0.2µm

Diluer au 1/10 dans du PBS

MTT 2mg/ml, congelé à -20°C ; prêt à l'emploi

Isopropanol.

Ajouter 100 µl de suspension cellulaire par puits (5.10^6 cell/ml)

Ajouter 50 µl de suspension bactérienne par puits (1.10^8 bact/ml) et préparer la courbe standard de dilution.

Incuber les bactéries et les neutrophiles pendant une heure à 37°C sous agitation.

Ajouter 50 µl de Saponin 0.2%

Ajouter 50 µl de MTT 2mg / ml

Incuber la plaque à 37°C pendant 45min.

Mesurer la densité optique à 560nm.

Références

AGNER K. (1941) : Verdoperoxidase. A ferment isolated from leucocytes. *Acta Physiol. Scand.* **2**(suppl 8): 1-62

AHMED M., et al. (2007) : Effects of leptin and tumor necrosis factor- α on degranulation and superoxide production of polymorphonuclear neutrophils from Holstein cows. *J. Vet. Med. Sci.* **69** (2) : 125-131.

AKIRA S. & TAKEDA, K. (2004) : Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* **4**(7) : 499-511.

ALSEMGEEST S.P.M., TAVERNE M.A.M., BOOSMAN R., VAN DER WEYDEN B.C., & GRUYS E. (1993) : Peripartum acute-phase serum amyloid-A concentration in plasma of cows and fetuses. *American Journal of Veterinary Research*, **54**(1), 164-167.

ALTIERI D.C., et al. (1988) : Adhesive receptor Mac-1 coordinates the activation of factor X on stimulated cells of monocytic and myeloid differentiation: an alternative initiation of the coagulation protease cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*,. **85** (20) : 7462-6.

ALTIERI D.C., et al. (1990) : A unique recognition site mediates the interaction of fibrinogen with the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Biol Chem*,. **265** (21) : 12119-22.

ANDING K., GROSS P., ROST J.M., ALLGAIER D., JACOBS E. (2003): The influence of uraemia and haemodialysis on neutrophil phagocytosis and antimicrobial killing. *Nephrology dialysis transplantation*, **18** : 2067-2073

ASSARI (2006) : *Medical Immunology* **5**:4 doi:10.1186/1476-9433-5-4

BABIOR M.B. (1999) : NADPH oxydase : an update. *Blood*. **93**(5) : 1464-1476

BADWEY (1984) : Effects of free fatty acids on release of superoxide and on change of shape by human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **259** (12) : 7870-7877.

BATES (1993) : Poly-unsaturated fatty acids increase neutrophil adherence and integrin receptor expression. *J. Leu. Biol* **53**: 420-426.

BANTON D.F., ULLYOT, J.L. & FARQUHAR M.G. (1971) : The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J. Exp. Med.* **134**: 907-934

BONNEFONT (2008) : Le potentiel redox et le milieu ruminal

BRAUN J.P. (2006) : Métabolisme général de l'azote. ENV. –S5- Module Physiologie – Biochimie

BROWN E.J. (1991) : Complement receptors and phagocytosis. *Curr Opin Immunol*,. **3** (1) : 76-82

CAMUSSI G., et al. (1983) : The release of platelet-activating factor from human endothelial cells in culture. *J Immunol*,. **131** (5): 2397-403.

CARLSON G.P. & KANEKO J.J. (1975) : Intravascular granulocyte kinetics in developing calves. *Am. J. Vet. Res.* **36**: 421-425

CENDOROGLO M. et al. (1999): Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10** : 93-100.

CHAVAKIS T., et al. (2004) : The junctional adhesion molecule-C promotes neutrophil transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Biol Chem*,. **279** (53) : 55602-8.

CIRIO A. et al. (2000) : Determination of parotid urea secretion in sheep by means of ultrasonic flow probes and a multifactorial regression analysis. *J. Anim. Sci.*, **78**, 471-476

COHEN B.G., RUIBAO R. & BALTIMORE D. (1995) : Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell*. **80**: 237-248

COLEMAN G.S. (1975) : The interrelationship between rumen ciliate protozoa and bacteria. In : *Mc Donald, W., Warner, A.C.I. (Eds.), Digestion and metabolism in the ruminant. The university of New England publ.;* 149-164.

COORAY R. (1996) : Casein effects on the myeloperoxidase-mediated oxygen dependant bactericidal activity of bovine neutrophils. *Immunol Immunopathol*. **51**: 55-65

DAHLGREN C., KARLSSON A. & BYLUND J. (2007) : Measurement of respiratory burst products generated by professional phagocytes. In *Methods in Molecular Biology, vol 412: Neutrophil Methods and Protocols. Edited by: M.T. Quinn, F.R. DeLeo & G.M. Bokoch ©Humana Press Inc. Totowa, NJ 23* pp 349- 363

DETMERS P.A., et al. (1990) : Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med*. **171** (4): 1155-62.

DISCIPO R.G., et al. (1998) : Human polymorphonuclear leukocytes adhere to complement factor H through an interaction that involves alphaMbeta2 (CD11b/CD18). *J Immunol.* **160** (8) : 4057-66.

DROGOUL C. et al (2004) : Nutrition et alimentation des animaux domestiques, Tome 1, deuxième édition : 55-65

EDBERG J.C., KIMBERLY R.P. (1994) : Modulation of Fc gamma and complement receptor function by the glycosyl-phosphatidylinositol-anchored form of Fc gamma RIII. *J Immunol.* **152** (12): 5826-35.

EMMANUEL B., EDJTEHADI M. (1981) : Glucose biokinetics in normal and urea-treated sheep. *Comp.Biochem.Physiol.*, **68B** : 550-560.

EMMANUEL B. et al. (1982) : Interrelationships between urea, ammonia, glucose, insulin and adrenaline during ammonia-urea toxicosis in sheep. *Comp.Biochem.Physiol.*, **72A** : 697-702.

ENJALBERT (2006) : Les matières azotées en alimentation animale, Cours d'alimentation D1, ENVT.

ENJALBERT F. (2008) : Relation alimentation-santé-production., ENVT, cours année d'approfondissement pathologie du bétail.

EUGENE M. (2002) : Effets de la défaunation de ruminants sur les performances de production, en fonction de la ration ingérée. Etude des variations de la Protéosynthèse et de la cellulolyse microbienne ruminale. *Th D., INAPG, Laboratoire de physiologie de la nutrition et alimentation* : 11-20

FERRATON (2010) : Excès chronique d'azote chez les bovins : biochimie sanguine et ruminale : étude expérimentale. *Th. : Med. Vet., Toulouse, Université Paul Sabatier, thèse : TOU 3 – 2010-003.127p.*

FERRIERES A. (2009) : Effets ruminiaux et sanguins d'un apport massif de tourteau de soja non tanné à des bovins. *Th. : Med. Vet., Toulouse, Université Paul Sabatier, thèse : 03- TOU 3- 4053. 156p.*

FONTY G., OBLIN K.N. (1991) : Rumen anaerobic fungi : their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fibre digestion. *In: Tsuda, T., Sasaki, Y., Kawashima, R. (Eds.), Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants.* : 655-679.

GERARD C. and N.P. GERARD (1994) : C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. *Annu Rev Immunol.*, **12** : 775-808.

GERARD N.P. and C. GERARD (1991) : The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature.*, **349** (6310): 614-7.

HAMPTON M.B., KETTLE A.J. & WINTERBOURN C.C. (1998) : Inside the neutrophil phagosome : Oxidants, Myeloperoxidase and Bacterial Killing. *Blood* **92(9)**: 3007-3017

HAUSSINGER D. (1990) : Nitrogen metabolism in liver : structural and functional organization and physiological relevance. *Biochem. J.*, **267** : 281-290.

HEIT B., et al. (2002) : An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J Cell Biol.*, **159** (1): 91-102.

HINO T., RUSSEL J.B. (1985) : Effect of reducing-equivalent disposal and NADH / NAD on deamination of amino acids by intact rumen micro-organisms and their cell extracts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50** : 1368-1374.

HOEBE K., JANSSEN E. & BEUTLER B. (2004) : The interface between innate and adaptative immunity. *Nature immunology* **5(10)** : 971-974

HORTON et al. (1994): Principes de Biochimie, Ed DeBoeck Université.

HUME I D (1970) : Synthesis of microbial protein in the rumen. III. The effect of dietary protein. *Australian journal of Agricultural Research*, **21**, 305-314.

INGRAHAM L.M., et al. (1982), Metabolic, membrane, and functional responses of human polymorphonuclear leukocytes to platelet-activating factor. *Blood*, **59** (6): p. 1259-66.

INRA (1988) : Alimentation des bovins, ovins et caprins, 75-93

JABER B.L. et al. (2001) : Mechanisms of neutrophils apoptosis in uraemia and relevance of the Fas (APO-1, CD95)/Fas ligand system. *Journal of leucocytes biology*. **69** : 1006-1012

JAIN N.C. (1993) : Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea and Febiger, 417

JEAN-BLAIN C. (2002) : Introduction à la nutrition des animaux domestiques : 53-73

KARLSSON A., NIXON J.B. & McPHAIL L.C. (2000) : Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Leukoc. Biol.* **67**: 396-404

KEHRLI M.E. et al. (1989) : Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am. J. Vet. Res.* **50** : 207-214

KLEBANOFF S.J. (1999) : Myeloperoxidase. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, **111**: 383-389

LAPIERRE H., BERTHIAUME R, RAGGIO G et al, (2005) : The route of absorbed nitrogen into milk protein. *Animal Science*, **80** : 11-22.

LEE E.K. and KEHRLI M. (1998) : Expression of adhesion molecules on neutrophils of periparturient cows and neonatal calves. *Am. J. Vet. Res.* **59** : 37-43

LLOYD W.E (1982): Urea and other nonprotein nitrogen sources. *In* : Howard (J.L.), *Current Veterinary Therapy Food Practice*. W.B. Saunders, Philadelphia, USA, , **2** : 354-356.

MACKIE R.I., WHITE B.A. (1990) : Symposium : Rumen microbial ecology and nutrition. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism : potential impact on nutrient output. *Journal of dairy science*, **73** : 2971-2995.

MALECH H.L. (2007) : The role of Neutrophils in the immune system. *In Methods in Molecular Biology, vol 412: Neutrophil Methods and Protocols. Edited by: M.T. Quinn, F.R. DeLeo & G.M. Bokoch ©Humana Press Inc. Totowa, NJ 1* pp 3- 11

MANCUSO P., et al. (1998) : 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* **66** (11): 5140-6.

MANCUSO P., NANA-SINKAM P., and PETERS-GOLDEN M. (2001) : Leukotriene B4 augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.*, **69** (4): 2011-6.

MatTekCoperation (page consultée le 26.05.09. Transwell® Permeable support (en ligne). Adresse URL : http://www.mattekcorp.com/Corning-Snapwell-Transwell_InstrManual.pdf

MAZO I.B. & VON ANDRIAN U.H. (1999) : Adhesion and homing of blood-borne cells in bone marrow microvessels. *J. Leukoc. Biol.* **66**: 25-32

McINTYRE T.M., ZIMMERMAN G.A., PRESCOTT S.M (1986) : Leukotrienes C4 and D4 stimulate human endothelial cells to synthesize platelet-activating factor and bind neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83** (7): 2204-8.

MEHRZAD J. et al.(2001) : Respiratory burst activity of blood and milk neutrophils in dairy cows during different stages of lactation. *J. Dairy Res.* **68** : 399-415

MEHRZAD J., DOSOGNE H., VANGROENWEGHE F. & BURVENICH C. (2001) : A comparative study of bovine blood and milk neutrophil functions with luminal-dependent chemiluminescence. *Luminescence.* **16**: 343-356

MILLET (2010) : Impact de l'excès chronique d'azote soluble dans la ration des bovins sur la diapédèse et la phagocytose des neutrophiles sanguins. *Th. : Med. Vet., Toulouse, Université Paul Sabatier, thèse : TOU 3 – 2010-4020.118p.*

MOLLER A.S., OVSTEBØ R., HAUG K.B., JOO G.B., WESTVIK A.B. & KIERULF P. (2005) : Chemokine production and pattern recognition receptor (PRR) expression in whole blood stimulated with pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Cytokine.* **32(6)**: 304-315

MONFARDINI E. et al. (2002) : Evaluation of L-selectin expression and assessment of protein tyrosine phosphorylation in bovine polymorphonuclear neutrophil leukocyte around parturition. *Vet. Res.* **33** : 1-5.

MONFARDINI E., VAN MERRIS V., PAAPE M., DUCHATEAU L. & BURVENICH C. (2004) : L-selectin and chemotaxis throughout bone marrow granulocyte maturation in the bovine. *J. Dairy Sci.* **87**: 3350-3357

MOREIRA DA SILVA F., BURVENICH C., MASSART-LEEN A.M. & BROSSE L. (1998) : Assessment of blood neutrophil oxidative burst activity in dairy cows during period of parturition. *Animal Science.* **67(3)**: 421-426

MOY J., GLEICH G., THOMAS L., (1990) : Noncytotoxic activation of neutrophils by eosinophil granule major basic protein: effect on superoxide anion generation and lysosomal enzyme release. *J. Immunol.* **145** : 2626–2632.

MURATA H., HORINO R. (1999) : Effects of *in vitro* atmospheric ammonia exposure on recovery rate and luminol-dependent chemiluminescence of bovine neutrophils and bronchoalveolar macrophages. *J. Vet. Med. Sci.* **61**, (3) : 279-281

NACCACHE P.H. (1984) : Modulation of rabbit neutrophils aggregation and dégranulation by free fatty acids. *J. Leu. Biol.* **36** : 333-340

NAGAHATA H., SAWADA C., HIGUCHI H., TERAOKA H. & YAMAGUCHI M. (1997) : Fc receptor-mediated phagocytosis, superoxide production and calcium signaling of beta 2 integrin-deficient bovine neutrophils. *Microbiol. Immunol.* **41** : 747-750

NATHAN C. (2006) : Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature rev. immunol.* **6**: 173-182

NAUSEEF W.M. (2004) : Assembly of the phagocyte NADPH oxydase. *Histochem. Cell biol.* **122(4)**: 277-291

NAUSEEF W.M., McCORMICK S. & GOEDKEN M. (2000) : Impact of missense mutations on biosynthesis of myeloperoxidase. *Redox Report*, **5**: 197-206

NAVETAT H. et al. (1999) : Perturbations acido-basiques et hydroélectrolytiques chez le veau atteint de troubles digestifs : évaluation et stratégies thérapeutiques. *Journées européennes de la Société Française de Buiatrie*, Paris – La Défense

NEWBOULD F.H. (1973) : The effect of added serum and glucose, and some inherent factors, on phagocytosis in vitro by milk leukocytes from several cows. *Can. J. Comp. Med.* **37**: 189-194

NUGENT J.H.A., MANGAN J.L. (1981) : Characteristics of the rumen proteolysis of fraction 1 (18S) protein from lucerne (*Medicago sativa* L). *Br. J Nutr.*, **46** : 39-58.

OSTERMANN G., et al. (2002) : JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol.*, **3** (2) : 151-8.

OTTONELLO L., et al (2004) : Leptin as a uremic toxin interferes with neutrophil chemotaxis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15** : 2366-2372.

PAAPE M., MEHRZAD J., ZHAO X., DETILLEUX J. & BURVENICH C. (2002) : Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Journal of mammary gland biology and neoplasia.* **7(2)**: 109-121

PAAPE M.J., BANNERMAN D.D., ZHAO X. & LEE J-W. (2003) : The bovine neutrophil : structure and function in blood and milk. *Vet. Res.* **34**: 597-627

PAAPE M.J., CARROLL D.W., KRAL A.J., MILLER R.H. & DESJARDINS C. (1974) : Corticosteroids, circulating leukocytes, and erythrocytes in cattle: diurnal changes and effects of bacteriologic status, stage of lactation, and milk yield on response to adrenocorticotropin. *Am. J. Vet. Res.* **35**: 355-362

PAAPE M.J., LILIUS E.M., WIITANEN P.A., KONTIO M.P. & MILLER R.H. (1996) : Intramammary defense against infections induced by *Escherichia coli* in cows. *Am. J. Vet. Res.* **57**: 477-482

PACCARD P. et al. (1992) : Métabolisme du rumen. Résumé des interventions et aspects pratiques. *Bull. GTV.*, 3, B, 425, 19-48

PACCAUD J.P., et al. (1990) : NAP-1/IL-8 induces up-regulation of CR1 receptors in human neutrophil leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun.*, **166** (1): 187-92.

PALMER R.M., et al. (1980) : Chemokinetic activity of arachidonic and lipoxygenase products on leucocytes of different species. *Prostaglandins.*, **20** (2): 411-8

PERIANAYAGAM M.C. et al. (2000) : Serum soluble Fas (CD95) and Fas ligand profiles in chronic kidney failure. *J. Lab. Clin. Med.*, **136**, (4) : 320-327

PERSSON K., LARSSON I. & HALLEN SANDGREN C. (1993) : Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vitro and in vivo. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **37**: 99-112

PODREZ E.A., ABU-SOUD H.M. & HAZEN S.L. (2000) : Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* **28**: 1717-1725

PRIYMENKO N. (1998) : Intoxication par l'azote non protéique. *Les Editions du point vétérinaire*, , **29** (numéro spécial) : 83 – 87.

PROBST A. et al, (2006) : Mechanisms of action of recombinant monoclonal antibodies used in oncology, *Bulletin du Cancer*. Volume 93, 107-12, Numéro hors-série, Avril 2006, Formation SFC

RADOSTITS O.M., GAY C.C., BLOOD D.C., and HINCHCLIFF K.W. (2007) : *Veterinary Medicine*. 10th edition : pp 2047

RAINARD P. & RIOLLET C. (2003) : Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reprod. Nutr. Dev.* **43**: 439-457

REED J.C. (2000) : Mecanisms of apoptotis. *Am. J. Pathol.* **157**: 1415-1430

REMOND D. et al. (1993) : Net transfer of uraemia and ammonia across the ruminal wall of sheep. *J. Anim. Sci.*, **71**, 2785-2792.

ROSS G.D. (2002) : Role of the Lectin domain of Mac-1/CR3 (CD11b/CD18) in regulating intercellular adhesion. *Immunologic Research.* **25(3)** : 219-227

SARDENBERG C., SUASSUNA P., ANDREOLI M.C.C., WATANABE R., DALBONI M.A., MANFREDI S.R., DOS SANTOS O.P., KALLAS E.G., DRAIBE S.A., CENDOROGLO M. (2006) : Effects of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. *Nephrology dialysis transplantation*, **21** : 160-165

SCALIA (2006) : In vitro effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability. *J. Dairy Sci.* **89** : 147-154.

SMITS E., BURVENICH C., GUIDRY A., ROETS E. (1998) : In vitro expression of adhesion receptors and diapedesis by polymorphonuclear neutrophils during experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis. *Infect. Immun.* **66 (6)** : 2529-2534.

SMITS E., BURVENICH C., GUIDRY A., HEYNEMAN, and A. MASSART-LEE`N. (1999) : Diapedesis across mammary epithelium reduces phagocytotic and oxidative burst of bovine neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **68** : 169–176.

STIEF W.T. (2003) : The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Medical Hypotheses.* **60** (4): 567-572

SYMONDS H.W. et al. (1981) : The maximum capacity of the liver of the adult dairy cow to metabolise ammonia. *Br.J.Nutr.*, **46** : 481-486.

TALAMAS-ROHANA P., et al. (1990) : Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150,95 and LFA-1 family of leukocyte integrins. *J Immunol.*, **144** (12): 4817-24.

THOMAS P.C, KELLY M.E. (1976) : The effect of frequency of feeding on milk secretion in the Ayrshire cow. *J. Dairy Res.*, **43**, 1-7.

TIZARD I.R. (1996) : Veterinary Immunology : an introduction-5th edition. 24-29

USHIDA K., JOUANY J.P., THIVEND P. (1986) : Role of rumen protozoa in nitrogen digestion in sheep given two isonitrogenous diets. *Br. J. Nutr.*, **56** : 407-419.

VAGNEUR M. (1994) : Relation nutrition fertilité chez la vache laitière. *Bull. GTV.*, 5, B, 490, 133-139.

VAN OOSTVELDT K., PAAPE M, BURVENICH C. (2002) : Apoptosis of bovine neutrophils following diapedesis through a monolayer of endothelial and mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* **85**:139–147.

VANHOLDER R. et al. (1991) : Phagocytosis in uremic and hemodialysis patients : a prospective and cross sectional study. *Kidney Int.* **39** : 320-327.

VANHOLDER R. et al. (1993) : Infectious morbidity and defects of phagocytic functions in end stage renal disease : a review. *J. Am. Soc. Nephrol.* **3** : 1541-1554.

VALLI V.E., HULLAND T.J., McSHERRY B.J., ROBINSON G.A. & GILMAN J.P. (1971) : The kinetics of haematopoiesis in the calf. I. An autoradiographical study of myelopoiesis in normal, anaemic and endotoxin treated calves. *Res. Vet. Sci.* **12**: 535-550

WISEK W.J (1984) : Ammonia : its effects on biological systems, metabolic hormones and reproduction. *J. Dairy Sci.*, **67** : 481-498.

WIRTH J.J. and KIERSZENBAUM F. (1985) : Stimulatory effects of leukotriene B4 on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* **134** (3): 1989-93.

WOLTER R. (1992) : Alimentation de la vache laitière. Editions France Agricole.

ZERBE H., SCHNEIDER N., LEIBOLD W., WENSING T., KRUIP T.A.M. & SCHUBERTH H.J. (2000) : Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. *Theriogenology.* **54**: 771-786.

ZHOU M., et al. (1993) : Cocapping of the leukoadhesin molecules complement receptor type 3 and lymphocyte function-associated antigen-1 with Fc gamma receptor III on human neutrophils. Possible role of lectin-like interactions. *J Immunol.*, **150** (7): 3030-41.

Toulouse, 2010

Nom : DE MARCHI

Prénom : Loïc

TITRE : Impact de l'excès chronique d'azote soluble dans la ration des bovins sur la diapédèse et la phagocytose des neutrophiles sanguins.

Résumé

Une meilleure connaissance des facteurs de risque des maladies infectieuses permet de mieux maîtriser leur apparition chez les ruminants. Le rôle d'un excès d'azote alimentaire dans l'augmentation de la fréquence de certaines infections bien que souvent évoqué, n'a jamais été démontré. Nous avons fait l'hypothèse que les fonctions des neutrophiles, qui sont les premières cellules à être mobilisées au cours de la réponse anti-bactérienne, pouvaient être diminuées lors d'excès azoté dans la ration des bovins. Pour cela, diverses fonctions neutrophiliques (diapédèse, phagocytose) ont été évaluées chez quatre mâles castrés recevant à tour de rôle des rations à 16, 20 et 24% de MAT. Les résultats obtenus montrent que l'augmentation d'azote soluble alimentaire modifie la réponse des neutrophiles à divers stimuli, avec pour conséquence possible, une diminution des capacités de défense immunitaire des animaux soumis à ces régimes.

MOTS CLES : azote, alimentation, neutrophiles, immunité, bovin

ENGLISH TITLE : Impact of chronic excess of soluble nitrogen in the ration of cattle on diapedesis and phagocytosis of blood neutrophils.

Summary

Better knowledge of risk factors for infectious diseases in ruminants is supposed to improve health management and decrease their occurrence. The possible role of a nitrogen diet excess is often evoked when frequency of bacterial infections is high, although that link was never clearly demonstrated. For that purpose, several neutrophilic functions (diapedesis, phagocytosis) were evaluated in four steers receiving alternately rations with 16, 20 and 24 % total crude proteins. The results show that an increase of diet soluble nitrogen modifies the response of blood neutrophils to miscellaneous stimuli. A possible consequence is a decrease of the immune defences of cattle subjected to these diets.

KEY WORDS : nitrogen, diet, neutrophils, immunity, cattle.