



## 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 : 5563](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID/5563)

**To cite this version :**

Gannac, Samuel. *Impact de l'excès aigu d'azote soluble dans la ration des bovins sur les fonctions des neutrophiles sanguins*.  
Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2011, 159 p.

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

---

# IMPACT DE L'EXCÈS AIGU D'AZOTE SOLUBLE DANS LA RATION DES BOVINS SUR LES FONCTIONS DES NEUTROPHILES SANGUINS

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

*par*

**GANNAC Samuel**

Né le 19 Janvier 1986 à VILLEFRANCHE DE ROUERGUE (12)

---

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

---

**JURY**

PRESIDENT :

**M. Bruno MARCHOU**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**M. Gilles FOUCRAS**

**M. Francis ENJALBERT**

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, Ecole Vétérinaire

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche  
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

**Directeur** : M. A. MILON

**Directeurs honoraires** M. G. VAN HAVERBEKE.  
M. P. DESNOYERS

**Professeurs honoraires** :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	M. DORCHIES
M. C. PAVAU	M. ECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*  
M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*  
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*  
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*  
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*  
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*  
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*  
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*  
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*  
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*  
M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*  
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*  
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*  
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*  
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*

M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*  
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*  
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*  
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*  
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

#### **PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

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

#### **MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*

#### **MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)**

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*  
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*  
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mme **PRIYENKO Nathalie**, *Alimentation*  
Mme **TROGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

**MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS**

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*
- M. **DASTE Thomas**, *Urgences-soins intensifs*

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS**

- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*
- Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
- Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*



# Remerciements

**A Monsieur le Professeur Bruno MARCHOU**

Professeur au CHU de Toulouse – Hôpital Purpan

*Maladies infectieuses et tropicales*

Qui nous fait l'honneur d'accepter la Présidence de ce Jury de Thèse

Qu'il veuille accepter mes hommages respectueux

**A Monsieur le Professeur Gilles FOUCRAS**

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

*Pathologie du bétail,*

Qui nous fait l'honneur de diriger ce Jury de Thèse

Pour sa disponibilité et ses conseils

Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude

**A Monsieur le Professeur Francis ENJALBERT**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

*Alimentation,*

Qui nous fait l'honneur de participer à ce Jury de Thèse

Qu'il veuille considérer mon respect le plus profond

**A Monsieur le Docteur Didier RABOISSON**

Assistant en Enseignement et en Recherche Contractuel à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

*Productions animales,*

Qui m'a proposé ce sujet, m'a encadré et a largement participé  
à la réalisation de ce travail.

Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements les plus sincères

## **Aux nombreuses personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail**

A **Cécile** et **Christian** du service de Microbiologie de l'ENVT, pour leur parfaite ponctualité, et pour leur main d'œuvre précieuse dans la réalisation des analyses *in vitro*

A l'équipe du laboratoire d'analyse des consultations canine de l'ENVT, pour leur rapidité et leur adaptation à nos souhaits

A **JM**, **Marcho** et **Ayen**, mes prédécesseurs de thèse, qui ont guidé mon travail

A ces quatre braves totes, et leur dévouement extrême pour la science

A **Richard** et les autres animaliers, pour le défumage – paillage minutieux

A **Rcmdr**, fidèle logiciel depuis poulot : aux innombrables heures qu'on a passées ensemble...

Aux fameux pains aux raisins de Didier tous les matins de manip, qui passaient tellement bien au petit creux de 9h...



## **A ma famille**

A **mes parents**, pour votre soutien permanent et l'amour que vous m'apportez. Vous m'avez donné tous les moyens pour arriver au bout, je vous dois cette réussite. Merci infiniment, je vous aime.

A **ma sœur**, pour ta bonne humeur et ton optimisme inconditionnels. Tu m'as longtemps servi d'exemple, je suis très fier d'avoir une sœur comme toi.

A **Benoit**, officiellement (enfin !) mon beau-frère, pour ta générosité et ta joie de vivre. Ma sœur et toi formez un couple magnifique, soyez heureux ensemble tout au long de votre vie.

A **mamie Denise**, parce que tu as toujours cru en ma réussite, je sais que tu as prié pour moi jusqu'au bout, merci du fond du cœur.

A **mamie Odette** et **papy Roger**, pour votre gentillesse, pour tous les repas de famille, et pour tout l'amour que vous témoignez envers vos petits-enfants.

A mes **oncles** et **tantes**, **cousins** et **cousines** ; **Christian** je sais que tu serais très fier de moi aujourd'hui, je ne t'oublie pas.

## **A mes amis**

A **mes collocs**, les meilleurs du monde : à **Fixou** – la bouliche, le solide au cœur tendre, à nos invites en soirée droit grâce à Jennifer, à Euskadi même si tu m'attends pas quand j'ai des crancran, à notre premier tour du poulot de l'histoire de l'ENVT, à tes slips Danger et à ta Braguette si mignonne : reste comme tu es (arrête de maigrir !), tu es un ami en or ; à **Martin** – le musclé, fidèle compagnon de raid aux mollets d'acier, à tes sprays en Nouvelle-Zélande, au grand trochitur, au ravino de la muerte, au Get de papy : toujours là pour une connerie ou les coups durs, notre amitié m'est très chère ; à **Gued** – l'homme à barbe, qui a failli me faire aimer l'OM et le pastis, à tes « doubles » du matin, aux gorges de l'Ardèche, aux cacas de cerfs néo-zélandais, à mes gâteaux de semoule : droit et sincère, tu es un ami exceptionnel ; à **Jérôme** – « l'ami Cal », à ta grande finesse, au Listel, à ta frère teuk légendaire, à tes nuggets crus et cramés, à ton mythique pack du matin « frange – lunettes – peignoir à carreaux – slip Indiana Jones » : mon petit bizuth est devenu bien grand, je suis fier de toi et d'être ton ami.

Les gars j'ai passé 4 années extraordinaires avec vous : merci infiniment pour tous ces souvenirs inoubliables, il faut que ça continue !!

A **Audrey** et **Florence**, les femmes de la maison, qui ont apporté un peu de douceur (et des crêpes et des gâteaux !) dans cette maison de rustres...

Aux **copains de promo**,

A **Michou**, grand ami, toujours de bon conseil ; à nos collocs en Bretagne et en B159, grâce à toi j'aime le beurre salé, tu peux en être fier !

A **Germain**, le bon copain, à toutes tes siestes en TD ; tu as été un vaillant co-délégué de repro, nos ronéos resteront dans les annales de l'école !

A **Gaston**, le petit-fils de PDG, le meilleur des faux-poulots de l'histoire, et à notre amour commun pour la rurale, ça fait plaisir !

A **Pinpin**, le marseillais par excellence, aux mauresques du Lardenn Bar ; tu es un copain de grande valeur, j'ai beaucoup apprécié le (trop) peu de moments qu'on a partagé...

A **Evence**, même si tu m'as défoncé l'épaule et mis la misère sur un col hors catégorie, je sais que les deux fois c'était sur un mal entendu ! Continue à être ambitieux, je suis sûr que tu iras très loin.

A **Lazagne**, fidèle compagnon de bovine ; à notre amitié retrouvée, aux raids, aux weekends de brimade, et surtout, à nos BDCDM !

A **Trapou** le roux, **Retournard** le bricolo, **Lulu Sebbag** le timide, **Javard** la blatte d'or, **Ed La Menace** l'ornithologue aventurier, **Pierre** le tarnais, à l'**Anarchiste** et son côté rural, à **Ben Cuq** le Bencuq.

A **Fraselle** ma binôme, à tous nos brillants rapports d'ambul et d'autops ; à **Nanard** (Jacardin !) et ton amour pour le Schelch, à **Manon Nichon** et ton endurance légendaire envers l'alcool ; à **Manon La Grande** et tes fameuses anecdotes d'Afrique ; à la mère **Auriol**, la meilleure des Morues de l'histoire ; à la Mère **Collange**, **Julie**, **Fauchon**, **La Pince**, **Morgane**, **Aline**.

Aux **copains de prépa**,

A **Carter**, à tes jeux de mots, tes guisements, à notre idole Cloclo : tu es un ami incomparable, j'espère du fond du cœur garder contact ; à **Thomas**, devenu la blaste, aux parties de ping-pong tout nus ; à **Timothée**, sosie officiel de Mac Gyver, à nos répets en salle de musique de Fermat... A notre inoubliable semaine de révisions au prieuré, à nos réveillons à trois, nos matches de foot déguisés, aux chorés de Cloclo, aux férias : vous avez égayé mon quotidien durant ces difficiles années de prépa, je ne l'oublierai pas.

A **Totofe** et **Psy**, fidèles compagnons de 5/2, à nos khôles et nos « TIPE gastronomiques »...

A **Appow**, **Maxime**, **Deï-Tos** le grec, et tous ceux qui n'ont pas suivi la voie des vétos.

### A nos plus jeunes poulots,

Aux **nouveaux miramariens** : **Gozlan** – le gitan (c'est quand tu veux que tu me rends mon ordi...), **Legros** – le lab geek (qui adore « leeeeeee get de papiii » !...), **Bastareau** – bon poulot ! (mon digne successeur de la place du concierge...), **Fages** – l'aveyronnois (régale tes colloqs d'aligot et de Roquefort !), **Langeois** – le batteur (Saint-Denis ! que trépasse si je faiblis !). Je suis fier que vous ayez repris notre belle maison, profitez-en à fond...

A **Cuquemelle** le normand, **Darty** l'homme en short, **Wawan** la Chotasse et tous les autres...

### A nos plus vieux poulots,

A **la Stabu** : à **Lecroq** (et ton appétit de moineau), **Hugues** (et ta confusion entre un urinoir et notre télé), **Mulhac** (et surtout, ne sois pas trop soul !), **Roumégous** (le bon vivant, je te prends aux quilles quand tu veux) et **Loïc**

A **la Bouille** : à **Noldou** (le plus grand nain du monde) et **Lili**, à **Maxou** – Chouchou (Iron Maaaaan !! tu l'auras un jour !), à **Clem** – le King (mon futur stagiaire...), à **Cheylan** (meilleur DJ de l'histoire de l'ENVT...). Aux rois du maquis, ça tue ça tue !

Aux **White Slipes** (Max le moche, Arthur le roux, Olivier le musclé et Agnès la chanteuse), à nos nombreuses répètes, je me suis bien fait plaisir avec vous !

A mes poulots de week-end, et tous les autres...

### A la promo des lourds

A tous ces bons vivants : **Nico** (« chevalier sonne les couleurs... Vey Vey !! »), **Bala** (copain de bras en écharpe...), **Françou** (la crevette, trop facile de t'arracher le t-shirt en boom), **Greg** (le fin du fin) ; sans oublier **Raph** (AAHH, Prosper !), **Ximun** (mon pti fillot), **Tutur** (Huss ! Prends une bièrrr...). Et même si le Cercle ne vous veut pas moi je vous aime...

A tout le groupe de TD de Sophie, à Bodow le rat de buffet, Chloé la maline...

### Aux « vieux »

Aux gouttes Rhymbow et Pauline pour cette année de bovine ; à Perrot le boiteux et Malin le Malin (et l'hôtel du gorille à Marseille), aux lourds Pauline et Guillaume, Croche et Daste, Jean-Sébastien (merci), Bali, Marcho, Steph ma carrette, Beubeuille, Schik et j'en oublie...

A nos docs, que je respecte énormément : JM (en souvenir du VRC...), Crado, Psy, La Dub, La Maug, Aude, Babar, Cariou, Ronsard, Bouss, Milou, Walou, Brice, Papa... Merci pour votre formidable « Accueil » et de m'avoir transmis les valeurs de cette école.

A toute l'équipe du service de bovine, profs, internes, CC, merci pour cette année de A5 très formatrice.

A tous les vétérinaires qui m'ont accueilli dans leur clinique (stage ou boulot), m'ont transmis leur passion du métier et ont guidé mes premiers pas.

**A l'ENVT et ses figures,**

A toi **Lulu**, à nos zinzins, ces après-midi à discuter avec toi, à tes centaines d'anecdotes : merci pour tout ce que tu as apporté à cette école et d'être resté jusqu'au bout, tu resteras à mes yeux l'emblème de cette école par excellence

A **Colette**, et à votre très agréable compagnie, aux bons et loyaux services que vous avez apportés à l'amicale : pour moi, la coopé gardera le nom de « chez Colette »

A **Roger** et ces grands apéros d'anat

A **Jean Phi** et tes deux « qualités » : la bière et le vélo

Au **Cercle**, et à son solide bar, qui j'espère endurera des cassages de sucre pendant encore des générations.

A la grosse **Totone**, le plus grand chien qui est vraiment trop méchant...

Le mot de la fin est destiné à la plus belle : pour toi **Sophie**, mon amour qui partage ma vie et qui m'offre tant d'amour au quotidien. Les moments passés avec toi me comblent de bonheur, et ne sont rien à côté de ce qui nous attend. Source d'équilibre, de douceur, de motivation, tu fais de moi un homme heureux... Je t'aime ma chérie !!

# Table des matières

<b>Table des Matières</b> .....	13
<b>Table des Encadrés</b> .....	17
<b>Table des Figures</b> .....	17
<b>Table des Photos</b> .....	19
<b>Table des Tableaux</b> .....	20
<b>Table des Annexes</b> .....	20
<b>Liste des abréviations</b> .....	21
<b>Introduction</b> .....	21
<b>PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE : Immunité antibactérienne et granulocytes neutrophiles</b> .....	25
<b>1. Biologie des neutrophiles dans l'espèce bovine</b> .....	27
1.1. Numération leucocytaire.....	27
1.1.1. Dans les conditions physiologiques.....	27
1.1.2. Facteurs de variation de la numération leucocytaire.....	28
1.1.2.1. Variations liées à l'âge.....	28
1.1.2.2. Variations liées au stade physiologique.....	29
1.1.2.3. Variations liées au stress.....	29
1.2. Morphologie du neutrophile bovin.....	30
1.2.1. Le neutrophile bovin mature.....	30
1.2.2. Autres caractères morphologiques des neutrophiles sanguins.....	32
1.3. Cycle de vie d'un granulocyte neutrophile.....	33
1.3.1. Origine des GNN.....	33
1.3.2. Une mort cellulaire programmée.....	35
<b>2. Fonctions des granulocytes neutrophiles</b> .....	37
2.1. Chimiotactisme.....	38
2.1.1. Principe.....	38
2.1.2. Les signaux chimiotactiques.....	38

2.1.2.1.	Le système du complément.....	38
i.	Définition.....	38
ii.	Mécanisme d'action.....	39
iii.	Propriétés biologiques.....	40
2.1.2.2.	Les médiateurs lipidiques.....	40
2.1.2.3.	Les molécules bactériennes.....	41
2.1.2.4.	Les chimiokines.....	41
2.1.2.5.	Autres signaux chimiotactiques.....	42
2.1.3.	Bilan du rôle des neutrophiles.....	42
2.1.4.	Migration guidée par les molécules chimiotactiques.....	43
2.1.4.1.	Les récepteurs impliqués dans l'attachement des neutrophiles aux cellules endothéliales.....	43
2.1.4.2.	Adhésion à l'endothélium.....	44
i.	Première étape : liaison des sélectines.....	45
ii.	Deuxième étape : activation des neutrophiles grâce aux signaux chimiotactiques.....	46
iii.	Troisième étape : adhésion des intégrines neutrophiliques aux récepteurs endothéliaux.....	46
2.1.4.3.	Transmigration des neutrophiles.....	47
2.2.	Reconnaissance de l'agent pathogène.....	48
2.2.1.	Rôle des récepteurs Toll-like dans la reconnaissance.....	48
2.2.2.	Opsonisation.....	49
2.2.3.	Reconnaissance non immunologique.....	50
2.2.4.	Les cascades d'activation du granulocyte neutrophile : synthèse.....	50
2.3.	La phagocytose.....	53
2.3.1.	Les étapes de la phagocytose.....	53
2.3.2.	Les granulations des neutrophiles.....	55
2.4.	La destruction du micro-organisme ingéré.....	56
2.4.1.	Le système de production de formes réactives de l'oxygène.....	56
2.4.1.1.	Le complexe NADPH oxydase initie les réactions de formation des FRO.....	57
i.	La NOX, un assemblage complexe de composants membranaires et cytosoliques.....	57
ii.	La NOX initie l'explosion respiratoire.....	59

2.4.1.2.	La formation des autres FRO.....	59
2.4.1.3.	Mesure de l'activité bactéricide par chimio-luminescence.....	61
2.4.2.	Les enzymes lytiques et les protéines antimicrobiennes.....	62
2.4.2.1.	Les enzymes lytiques.....	62
2.4.2.2.	Les peptides antimicrobiens.....	62
2.4.2.3.	Le lysozyme.....	63
2.4.2.4.	Les lectines.....	63
2.4.2.5.	Les protéines chélatrices du Fer.....	63
2.4.3.	Les conditions d'activation des enzymes dans la vacuole phagocytaire.....	64
2.4.4.	Le neutrophile et ses limites.....	65
2.4.5.	Les variations des capacités neutrophiliques.....	67
2.5.	Le neutrophile du lait.....	67
2.6.	Le neutrophile, un effecteur incontournable de la défense de l'organisme.....	68
2.6.1.	Immunodéficience iatrogénique.....	68
2.6.2.	Immunodéficience héréditaire.....	69
2.6.2.1.	Immunodéficience et adhésion des neutrophiles : exemple de la LAD.....	69
2.6.2.2.	Immunodéficience et dysfonctionnement du métabolisme oxydatif : exemple de la CGD.....	70
2.6.3.	Immunodéficience et métabolisme azoté.....	70
2.6.3.1.	Les bases du métabolisme azoté chez les ruminants.....	70
2.6.3.2.	Immunodéficience et hyper-urémie.....	72

## **PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE.....74**

<b>1. Matériel et Méthodes.....</b>	<b>74</b>
1.1. Les animaux.....	74
1.2. Date et lieu de l'étude.....	74
1.3. Alimentation et protocole expérimental.....	75
1.3.1. Rationnement pré-essai.....	75
1.3.2. Rationnement expérimental.....	75
1.3.3. Schéma expérimental.....	76

1.4.	Prélèvements sanguins.....	77
1.4.1.	Biochimie.....	77
1.4.1.1.	Les gaz sanguins.....	77
1.4.1.2.	Paramètres métaboliques.....	78
1.4.1.3.	Archivage.....	78
1.4.1.4.	Autres paramètres biochimiques.....	79
1.4.2.	Immunologie.....	79
1.5.	Analyses immunologiques.....	80
1.5.1.	Préparation des cellules.....	80
1.5.1.1.	Séparation et purification des neutrophiles.....	80
1.5.1.2.	Comptage des cellules.....	80
1.5.1.3.	La cytométrie en flux : principe et utilisation.....	80
i.	Principe de la cytométrie en flux.....	81
ii.	La cytométrie en flux : applications.....	82
1.5.2.	Analyse de l'expression des marqueurs membranaires CD11b et CD62L.....	82
1.5.3.	Analyse des fonctions cellulaires.....	83
1.5.3.1.	Préparation du zymozan activé.....	83
1.5.3.2.	Mesure de la production de radicaux libres.....	83
1.5.4.	Analyse de la bactéricidie.....	84
1.6.	Analyses statistiques.....	85
1.6.1.	Effet ration.....	85
1.6.1.1.	Sur les paramètres immunologiques et biochimiques cumulatifs.....	85
1.6.1.2.	Sur les paramètres biochimiques ponctuels.....	86
1.6.2.	Effet d'un paramètre biochimique.....	86
1.6.3.	Effet instantané.....	87
1.6.4.	Interaction entre paramètres biochimiques cumulatifs.....	87
<b>2.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>88</b>
2.1.	Description des paramètres biochimiques.....	88
2.1.1.	Cinétique de l'ammoniémie et de l'urémie.....	88
2.1.2.	Mesure des autres paramètres biochimiques.....	91
2.1.3.	Effet de la ration sur les paramètres biochimiques.....	92



2.2.	Numération des neutrophiles et pureté après purification.....	94
2.2.1.	Numération et formule leucocytaire.....	94
2.2.1.1.	Analyse globale.....	94
2.2.1.2.	Analyse en fonction des paramètres Animal, Session et Ration.....	94
2.2.1.3.	Analyse en fonction des paramètres biochimiques.....	95
2.2.2.	Pureté des neutrophiles.....	96
2.2.2.1.	Analyse globale.....	96
2.2.2.2.	Analyse en fonction des paramètres Animal, Session et Ration.....	97
2.2.2.3.	Analyse en fonction des paramètres biochimiques.....	97
2.3.	Expression des récepteurs membranaires.....	99
2.3.1.	Expression du marqueur CD62L.....	99
2.3.1.1.	Analyse globale.....	99
2.3.1.2.	Analyse en fonction des paramètres Animal, Session et Ration.....	99
2.3.1.3.	Analyse en fonction des paramètres biochimiques.....	100
2.3.2.	Expression du marqueur CD11b.....	102
2.3.2.1.	Analyse globale.....	102
2.3.2.2.	Analyse en fonction des paramètres Animal, Session et Ration.....	102
2.3.2.3.	Analyse en fonction des paramètres biochimiques.....	102
2.4.	Les fonctions oxydatives des neutrophiles.....	103
2.4.1.	Analyse globale.....	103
2.4.2.	Analyse en fonction des paramètres Animal, Session et Ration.....	104
2.4.3.	Analyse en fonction des paramètres biochimiques.....	105
2.4.3.1.	Hors stimulation.....	105
2.4.3.2.	Après stimulation avec l'OZP.....	106
2.4.3.3.	Après stimulation avec le PMA.....	106
2.5.	Bactéricidie.....	108
2.5.1.	Analyse globale.....	108
2.5.2.	Analyse en fonction des paramètres Animal, Session et Ration.....	109
2.5.3.	Analyse en fonction des paramètres biochimiques.....	109
2.6.	Interactions entre les paramètres biochimiques.....	110

2.7.	Bilan des effets.....	112
<b>3.</b>	<b>Discussion et perspectives.....</b>	<b>113</b>
3.1.	Points forts et limite de l'étude.....	114
3.1.1.	Animaux utilisés dans l'étude.....	114
3.1.2.	Le prélèvement des échantillons.....	116
3.1.3.	Les analyses de laboratoire.....	116
3.1.4.	Les limites de l'interprétation de l'analyse statistique.....	119
3.1.5.	Mesure de la fonction oxydative des GNN.....	120
3.2.	Discussion des effets.....	120
3.2.1.	Effets de la proportion de matière azotée totale : effet Ration.....	120
3.2.2.	Numération cellulaire et expression de CD62L.....	121
3.2.3.	Expression du récepteur CD11b.....	123
3.2.4.	Production des formes réactives de l'oxygène en fonction du mode d'activation des neutrophiles.....	124
3.2.4.1.	Production basale.....	124
3.2.4.2.	Après activation.....	125
3.2.5.	Le pouvoir bactéricide.....	127
3.2.6.	Synthèse des effets.....	128
3.3.	Perspectives.....	130
	<b>Conclusion.....</b>	<b>131</b>
	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>133</b>

## Table des Encadrés

<b>Encadré 1</b> : L'importance des protéines membranaires dans la réponse immunitaire : exemple de CD62L et CD11b/CD18.....	52
<b>Encadré 2</b> : La myéloperoxydase, enzyme clef des défenses anti-bactériennes.....	60
<b>Encadré 3</b> : La lactoferrine, une molécule multifonctionnelle.....	63
<b>Encadré 4</b> : Adaptation des bactéries pour échapper aux phagocytes.....	66

## Table des Figures

<b>Figure 1</b> : Les différents compartiments des GNN dans l'organisme.....	33
<b>Figure 2</b> : Schéma récapitulatif des fonctions du neutrophile humain mature.....	37
<b>Figure 3</b> : Comparaison des voies classique et alterne du complément.....	39
<b>Figure 4</b> : Principaux récepteurs membranaires des neutrophiles.....	43
<b>Figure 5</b> : Les étapes d'adhésion et de migration des GNN à travers l'endothélium vasculaire.....	45
<b>Figure 6</b> : Oponisation des bactéries par des immunoglobulines et des molécules du complément.....	50
<b>Figure 7</b> : Voies de la Phosphatidyl-inositol -3 Kinase (Pi3-K) et voie de la MAP Kinase...51	
<b>Figure 8</b> : Les étapes de la phagocytose.....	54
<b>Figure 9</b> : Les mécanismes de reconnaissance immunologiques et non immunologiques précédant la phagocytose.....	54
<b>Figure 10</b> : Les principaux composants des granules cytoplasmiques des neutrophiles et leurs fonctions.....	56
<b>Figure 11</b> : Les réactions principales de l'explosion respiratoire des neutrophiles.....	57
<b>Figure 12</b> : Représentation schématique de l'enzyme NADPH oxydase.....	58
<b>Figure 13</b> : Schéma du mécanisme de chimioluminescence au luminol.....	62
<b>Figure 14</b> : Représentation schématique des échanges membranaires du phagolysosome lors de l'explosion respiratoire.....	65
<b>Figure 15</b> : Représentation schématique de certains mécanismes développés par les bactéries pour échapper aux phagocytes.....	66
<b>Figure 16</b> : Schéma de l'utilisation métabolique de la Matière Azotée chez les ruminants....	71
<b>Figure 17</b> : Illustration du principe de cytométrie en flux.....	81

<b>Figure 18</b> : Cytogramme obtenu par cytométrie en flux.....	81
<b>Figure 19</b> : Variations de l'ammoniémie en fonction de l'animal au cours du premier jour de la session 1 (A) et variations moyennes de l'ammoniémie au cours du premier jour des 2 sessions en fonction de la ration (B).....	89
<b>Figure 20</b> : Variations de l'urémie en fonction de l'animal au cours du premier jour de la session 1 (A) et variations moyennes de l'urémie au cours du premier jour des 2 sessions en fonction de la ration (B).....	90
<b>Figure 21</b> : Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et Ration (Diet 1, 2) sur l'ammoniémie (NH3Mean89 en 0,1 mmol.l-1).....	92
<b>Figure 22</b> : Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et Ration (Diet 1, 2) sur l'urémie (UreaMean89 en 0,1 mmol.l-1).....	93
<b>Figure 23</b> : Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et Ration (Diet 1, 2) sur la kaliémie (KMean89 en 0,1 mmol.l-1) .....	93
<b>Figure 24</b> : Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (1, 2) et Ration (Diet 1, 2) sur le nombre de neutrophiles circulants ( $10^9$ cellules.l-1 de sang).....	95
<b>Figure 25</b> : Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et Urée (UreaMean89, 0,1 mmol.l-1) sur le nombre de neutrophiles circulants ( $10^9$ cellules.l-1 de sang).....	95
<b>Figure 26</b> : Effets de l'urée (UreaMean89, 0,1 mmol.l-1) (A) et du Trou Anionique (AGMean89, 0,1 mmol.l-1) (B) sur la pureté des neutrophiles (%).....	98
<b>Figure 27</b> : Effet de la glycémie (GlucMean89, 0,1 mmol.l-1) sur la pureté des neutrophiles (%).....	98
<b>Figure 28</b> : Effet Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et Ration (Diet 1, 2) sur l'expression de CD62L (MFI).....	100
<b>Figure 29</b> : Effet Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et NH <sub>3</sub> (NH3Mean89, 0,1 mmol.l-1) sur l'expression de CD62L (MFI).....	100
<b>Figure 30</b> : Effet Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et Urée (UreaMean89, 0,1 mmol.l-1) sur l'expression de CD62L (MFI).....	100
<b>Figure 31</b> : Effet Animal (A, B, C, D), Session (Ses 1 ou 2) et Potassium (Kmean89, 0,1 mmol.l-1) sur l'expression de CD62L (MFI).....	101
<b>Figure 32</b> : Effet Animal (Nom A, B, C, D), Session (1, 2) et Glucose (GlucMean89, 0,1 mmol.l-1) sur l'expression de CD62L (MFI).....	101
<b>Figure 33</b> : Chimioluminescence moyenne globale (cpm) en fonction des différentes concentrations d'activateur utilisées.....	104

<b>Figure 34</b> : Effet Animal (Nom A, B, C, D), Session (1, 2) et Ration (Diet 1, 2) sur la production spontanée des FRO des neutrophiles (No Stim, MFI).....	105
<b>Figure 35</b> : Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et pH (pHMean89, 0,1 unité) sur la production spontanée des FRO des neutrophiles (No Stim, MFI).....	105
<b>Figure 36</b> : Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et pH (pHMean89, 0,1 unité) sur la chimioluminescence des GNN activés avec l'OZP à 80 µg.ml-1 (OZP 0,8) (MFI)....	106
<b>Figure 37</b> : Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et pH (pHMean89, 0,1 unité) sur la chimioluminescence des GNN activés avec le PMA à 0,01 µM (PMA 0,01, en MFI).....	107
<b>Figure 38</b> : Graphe des effets de l'interaction entre les facteurs NH <sub>3</sub> instantané (NH <sub>3</sub> Pt) et Animal (Nom A, B, C, D) (à gauche) et de l'interaction entre les facteurs NH <sub>3</sub> Pt et Session (Ses 1, 2) (à droite) sur la chimioluminescence des GNN activés avec le PMA à 0,01 µM (PMA 0,01, en MFI).....	108
<b>Figure 39</b> : Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et pH (pHMean89, 0,1 unité) sur la bactéricidie (bact, %).....	109
<b>Figure 40</b> : Effets Animal (A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et glucose (GlucMean89, 0,1 mmol.l-1) sur la bactéricidie (bact. %).....	109
<b>Figure 41</b> : Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et chlore (ClMean89, 0,1 mmol.l-1) sur la bactéricidie (bact, %).....	110
<b>Figure 42</b> : Bilan des interactions entre paramètres biochimiques et de leurs effets sur les fonctions neutrophiliques.....	112

## Table des Photos

<b>Photo 1</b> : Vue en microscopie optique (grossissement x 1250) de neutrophiles bovins matures après coloration de Wright.....	30
<b>Photo 2</b> : Vue en microscopie électronique à transmission (grossissement x 15000) d'un GNN bovin mature.....	31
<b>Photo 3</b> : Vue en microscopie électronique à balayage (grossissement x 2500) de leucocytes bovins.....	31
<b>Photos 4 A, B et C</b> : Vues en microscopie optique (grossissement x 1250) de GNN bovins immatures après coloration de Wright.....	32

## **Table des Tableaux**

<b>Tableau 1</b> : Valeurs usuelles des leucocytes sanguins chez le bovin adulte.....	27
<b>Tableau 2</b> : Variation des paramètres hématologiques en fonction de l'âge dans la race Prim'Holstein.....	28
<b>Tableau 3</b> : Composition des rations (aliment en kg de MB par jour).....	76
<b>Tableau 4</b> : Ration distribuée à chaque session pour chaque animal durant l'étude.....	76
<b>Tableau 5</b> : Répartition des bœufs dans les salles pour chaque session.....	76

## **Table des Annexes**

<b>Annexe 1</b> : Caractéristiques des 2 rations expérimentales (logiciel Larelev® 2009).....	149
<b>Annexe 2</b> : Calendrier expérimental.....	152
<b>Annexe 3</b> : Purification des neutrophiles : protocole expérimental.....	153
<b>Annexe 4</b> : Expression des marqueurs de surface CD11b et CD62L : protocole expérimental.....	154
<b>Annexe 5</b> : Protocole de préparation du zymozan activé.....	155
<b>Annexe 6</b> : Test de chimioluminescence au luminol : protocole expérimental.....	156
<b>Annexe 7</b> : Test de bactéricidie : protocole expérimental.....	157
<b>Annexe 8</b> : Méthode de calcul de l'aire sous la courbe de la cinétique d'un paramètre biochimique à travers un exemple.....	159

# Liste des abréviations

**ACD** : Acide-Citrate-Dextrose

**Ag** : Antigène

**AGNE** : Acides Gras Non Estérifiés

**AGV** : Acides Gras Volatils

**A.M.V** : Aliment Minéral Vitaminé

**ANP** : Azote Non Protéique

**BOHB** :  $\beta$ -hydroxy-butyrate

**CAM** : Molécules d'Adhésion Cellulaire

**CAMC** : Complexe d'Attaque Membranaire du Complément

**CD** : Classe de Différentiation

**CFU-GM** : Unité de Formation de Colonie commune aux Granulocytes et aux Macrophages

**CGD** : Chronic Granulomatous Disease

**CL** : Chimioluminescence

**fLMP** : Formylméthionyl-Leucyl-Penylalanine

**Fas-L** : Ligand Fas

**Fc** : Fragment Constant

**FcR** : Récepteur Fc

**FRO** : Formes Réactives de l'Oxygène

**GNN** : Granulocyte Neutrophile

**GSH-Px** : Glutathion Peroxydase

**ICAM** : Molécules d'Adhérence Inter-Cellulaire

**IFN $\gamma$**  : Interféron  $\gamma$

**Ig** : Immunoglobuline

**IL-8** : Interleukine 8

**IP** : Iodure de Propinium

**ITAM** : Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif

**JAM** : Junctional Adhesion Molecule

**LBP** : LPS Binding Protein

**Lf** : Lactoferrine

**LPS** : Lipopolysaccharide

**LTA** : Lipoteichoic Acid

**LTB<sub>4</sub>** : Leukotriène B<sub>4</sub>  
**MAM** : Matière Azotée d'origine Microbienne  
**MAPK** : Mitogen Activated Protein Kinase  
**MAT** : Matière Azotée Totale  
**MB** : Matière Brute  
**MBL** : Mannose-Binding Protein  
**mCD14** : CD14 membranaire  
**MFI** : Mean Fluorescence Intensity  
**MPO** : Myéloperoxydase  
**NADP** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate  
**NOX** : NADPH Oxydase  
**PAF** : Platelets Activating Factor  
**PBMC** : Peripheral Blood Mononuclear Cell  
**PDI** : Protéines Digestibles dans l'Intestin  
**PDIA** : Protéines réellement Digérées dans l'Intestin d'origine Animale  
**PDIM** : Protéines réellement Digérées dans l'Intestin d'origine Microbienne  
**PECAM** : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule  
**PIA** : Protéines Intestinales d'origine Animale  
**PIM** : Protéines Intestinales d'origine Microbienne  
**PKC** : Protéine Kinase C  
**PRR** : Pattern Recognition Receptor  
**sCD14** : CD14 soluble  
**SOD** : Super Oxyde Dismutase  
**TLR** : Toll-like Receptors  
**TNF $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
**VU** : Valeur Usuelle



# Introduction

Les maladies infectieuses endémiques ont un impact économique majeur dans les élevages de ruminants : pertes directes (mortalité, baisse de productivité), et indirectes (coûts de maîtrise)... Par exemple, l'impact économique global des mammites en élevage laitier s'élève à près de 80 euros par vache et par an (*Seegers 2003*). Alors que certains facteurs de risques associés aux infections mammaires sont de mieux en mieux maîtrisés (conditions d'ambiance, technique de traite, sélection génétique...), d'autres demeurent difficilement contrôlables. Il est par exemple fréquemment constaté une augmentation de l'incidence des mammites et métrites au sein du troupeau à certaines périodes critiques en relation avec des modifications brutales de l'alimentation, comme lors de la mise à l'herbe par exemple.

Les agents pathogènes responsables de mammites ont plusieurs sources :

- Un réservoir mammaire, lorsque l'infection d'un quartier sain se fait à partir d'un quartier infecté du même ou d'un autre animal, en relation avec une maîtrise insuffisante de l'hygiène de la traite
- Un réservoir environnemental, lorsque des germes environnementaux présents dans la litière par exemple sont impliqués
- Une origine mixte, lorsque les deux réservoirs précédemment cités coexistent.

Lors de la mise à l'herbe, alors que les conditions de traite sont inchangées, le passage d'une aire paillée vers un parcours extérieur suppose une diminution de la densité animale et de la pression d'infection d'origine environnementale. Le milieu, qui est un facteur favorisant de l'apparition des mammites, n'est donc pas impliqué de façon significative dans l'apparition de ces infections. Il faut donc rechercher ailleurs l'origine de la prédisposition à ces infections, par exemple en relation avec une modification du rationnement. En effet, une particularité de la composition de la ration des ruminants à cette période est la forte teneur en azote soluble présent dans l'herbe à un stade végétatif précoce.

La mise en évidence des pathologies infectieuses peu de temps après la mise à l'herbe, alors que l'exposition aux pathogènes est à priori diminuée, suppose une moindre résistance des animaux. Or l'issue d'une infection est conditionnée par la réactivité du système immunitaire dont le but est d'éliminer les germes qui colonisent l'organisme à partir des portes d'entrées

mucosales. La présence et l'activité des granulocytes neutrophiles, cellules pivots de la réponse immunitaire précoce vis-à-vis des bactéries, et considérés comme une des principales barrières de défense de la mamelle, sont donc primordiales pour limiter l'apparition de mammites cliniques. Une diminution des capacités de réponse des cellules immunitaires associée à un excès aigu d'azote soluble est donc possiblement à l'origine de l'augmentation des pathologies d'origine infectieuse.

Comment expliquer cette baisse de résistance ? Outre le stress engendré par le changement de conduite, une des hypothèses avancées implique la modification brutale de la ration alimentaire. En effet, la mise à l'herbe s'accompagne d'une augmentation de la teneur en matière azotée de la ration, qui se traduit par des modifications métaboliques. Par exemple, une ration riche en azote soluble entraîne une augmentation de la production d'ammoniac dans le rumen et d'urée par le foie, et donc l'augmentation de la concentration de ces métabolites dans le sang et leur distribution vers tous les organes.

En médecine humaine, l'étude de patients souffrant d'insuffisance rénale montre que des valeurs élevées de l'urémie sont à l'origine de perturbations de l'activité des granulocytes neutrophiles, dont le rôle est prépondérant 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'incrimination des métabolites de l'azote dans l'altération des capacités immunitaires des polynucléaires neutrophiles nous a conduits à étudier leurs fonctions dans le cas de deux rations isoénergétiques dont les teneurs en matière azotée totale sont respectivement de 14 et de 20 %.

Le document comporte une partie introductive basée sur la bibliographie décrivant les mécanismes d'action de l'immunité en relation avec l'élimination des agents pathogènes et les fonctions des granulocytes neutrophiles, avant la présentation de la démarche expérimentale, et des résultats obtenus au cours de cette étude.

# Partie I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## Immunité antibactérienne et granulocytes neutrophiles

Le système immunitaire a pour objectif de maintenir l'homéostasie de l'organisme, en particulier de prévenir la pénétration et la multiplication d'agents pathogènes étrangers : bactéries, virus, parasites le plus souvent, mais aussi cellules tumorales ou issues d'un organisme différent (greffe d'organe, transfusion...). La base de son fonctionnement repose donc sur la distinction entre les composants du référentiel immunitaire (auparavant désigné comme le « soi » immunologique) et des composants étrangers, en particulier lorsqu'ils proviennent d'organismes vivants, grâce à un système de reconnaissance complexe.

L'étude de l'immunité est habituellement séparée en deux grands types : l'immunité innée ou spontanée (dite aussi non spécifique, ce qui est un terme impropre) et l'immunité acquise ou adaptative (dite également spécifique). Cette dichotomie est en réalité artificielle puisque ces deux types d'immunité sont liés et interagissent dès le début d'une réponse immunitaire.

L'immunité innée repose sur des mécanismes déjà fonctionnels avant tout contact préalable avec l'Ag ; leur action est donc immédiate. Lorsqu'une bactérie pathogène parvient à déjouer les mécanismes protecteurs des barrières physico-chimiques (revêtement cutanéomuqueux, escalator muco-ciliaire, pH gastrique, ...), la réponse immunitaire spontanée fait intervenir principalement un type de leucocytes, les granulocytes neutrophiles (GNN), en association avec les macrophages.

Ces globules blancs, dont le noyau a un aspect segmenté, jouent un rôle prépondérant dans la réaction inflammatoire et dans le déroulement de la réponse immunitaire. Alors que la rapidité de migration des neutrophiles vers le site inflammatoire et leur capacité d'ingestion de microorganismes sont connus depuis le début du XXème siècle, il a fallu attendre les années 1960 pour montrer que les GNN sont aussi capables de produire des molécules oxydatives bactéricides et de libérer des substances antimicrobiennes (*Babior 1973, Klebanoff 1967, et Leher 1969*). Ils sont aujourd'hui considérés comme la première barrière de défense vis-à-vis des bactéries lorsque ces dernières réussissent à s'introduire dans l'organisme. Leur courte durée de vie dans le courant sanguin, par rapport aux leucocytes mononuclées notamment, a rendu leur étude difficile et provoqué un certain désintérêt de la part des immunologistes.

Mais des études plus récentes, notamment sur l'immunité spécifique, les placent comme l'un des pivots de l'immunité acquise puisqu'ils constituent en quelque sorte le bras armé de cette réponse (*Hoebe 2004*).

Les GNN occupent aujourd'hui une place importante dans les recherches en immunologie. En médecine bovine, ils sont encore aujourd'hui étudiés pour leur rôle dans la défense de la glande mammaire (*Paape 2002*).

Ainsi, même si la réponse immunitaire fait intervenir de nombreux autres acteurs, le rôle des neutrophiles en tant qu'effecteur ou messenger dans la défense de l'organisme est primordial.

Dans cette partie bibliographique, nous allons successivement étudier la biologie des granulocytes neutrophiles, puis leur rôle dans l'immunité bactérienne.

# 1. Biologie des neutrophiles dans l'espèce bovine

## 1.1. Numération leucocytaire

### 1.1.1. Dans les conditions physiologiques

Contrairement à de nombreuses espèces de mammifères chez lesquelles les GNN sont majoritaires parmi les leucocytes sanguins, chez les bovins, les GNN représentent environ 25-35% de la quantité totale de leucocytes dans les conditions physiologiques (cf. tableau 1) ; par conséquent, les lymphocytes sont majoritaires (58 % des globules blancs). Si l'on considère le volume sanguin total d'un bovin adulte (8% du poids vif environ), le nombre de GNN matures circulants est de l'ordre de  $10^{12}$  cellules (*Paape 1979*). En plus de ces GNN circulants se rajoute un pool de GNN matures marginés, c'est-à-dire adhérents à la paroi interne des vaisseaux sanguins. Cette réserve de GNN correspond à 50-60 % du nombre de neutrophiles circulants (*Paape 1974*).

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

**Tableau 1** : Valeurs usuelles des leucocytes sanguins chez le bovin adulte (*d'après Radostits 2007*)

Dans le sang, on retrouve principalement des neutrophiles segmentés matures, et parfois des neutrophiles immatures appelés aussi « band cells » à cause de la forme de leur noyau. En microscopie, le noyau des neutrophiles matures apparaît plurilobé, alors qu'un neutrophile immature possède un noyau non segmenté, souvent en forme de fer à cheval. En 1904, Arneth a montré que le nombre de lobes du noyau est en lien direct avec le degré de

maturité du neutrophile: plus le stade de maturation augmente, plus les lobes du noyau sont marqués et nombreux.

### 1.1.2. Facteurs de variation de la numération leucocytaire

En réponse à une inflammation ou à une infection, le système immunitaire mobilise des globules blancs (neutrophiles notamment) depuis la moelle osseuse dans le courant circulatoire. Cela se traduit par une leucocytose réactive (*Jain 1993*). En dehors de cette situation pathologique, d'autres facteurs physiologiques peuvent modifier la numération des GNN, soit en augmentant leur nombre (neutrophilie), soit en la diminuant (neutropénie).

#### 1.1.2.1. Variations liées à l'âge

Le nombre de neutrophiles varie en fonction de l'âge de l'animal. Ainsi le veau naissant n'a pas la même formule sanguine qu'un bovin adulte. La mise bas est précédée d'une hypercortisolémie fœtale, à l'origine du déclenchement du part (*Alsemgeest 1993*). Le cortisol induit une leucocytose, composée essentiellement d'une neutrophilie (8 à  $10 \cdot 10^9$  cellules.l-1) et d'une lymphopénie (moins de  $3 \cdot 10^9$  cellules.l-1). Le rapport Neutrophiles : Lymphocytes est alors supérieur à 2 : 1. Il s'inversera dans les premières semaines de vie pour se stabiliser autour de 1 : 2, en raison de la diminution du nombre de neutrophiles circulants et de l'augmentation simultanée de celui des lymphocytes. Le tableau 2 illustre l'évolution des paramètres hématologiques des bovins de la race Prim'Holstein.

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

**Tableau 2 :** Variation des paramètres hématologiques en fonction de l'âge dans la race Prim'Holstein (d'après *Jain 1993*)

### **1.1.2.2. Variations liées au stade physiologique**

Au cours de la gestation, le nombre de neutrophiles, notamment les GNN immatures, augmente progressivement (*Pramanik 2007*).

Ainsi le stade physiologique intervient dans le nombre et l'activité des neutrophiles circulants. La période qui suit immédiatement la mise bas correspond à une phase pendant laquelle les GNN sont plus sensibles à l'apoptose, et leurs fonctions sont altérées : cela conduit probablement à l'augmentation de l'incidence des mammites et des endométrites.

### **1.1.2.3. Variations liées au stress**

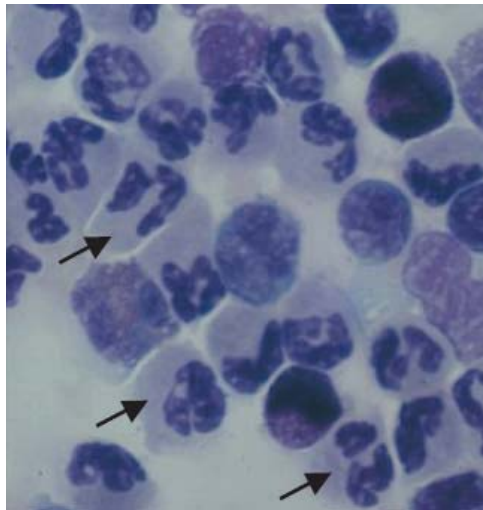
Des sources majeures de la variation du nombre de neutrophiles sont les facteurs liés au stress. Un stress physique ou émotionnel, un effort physique intense entraînent une leucocytose dite physiologique et un leucogramme de stress, par opposition à la leucocytose réactive en réponse à l'inflammation ou à l'infection. Ces modifications sont le résultat des effets de l'adrénaline et du cortisol endogène libérés en situation de stress. L'adrénaline provoque une contraction de la rate et une démarginalisation des leucocytes (GNN et/ou lymphocytes). L'hypercortisolémie est également responsable de la démarginalisation, mais aussi de la diminution de la diapédèse des GNN et de la libération de neutrophiles matures stockés dans la moelle osseuse. La neutrophilie peut atteindre  $12 \cdot 10^9$  cellules.l-1 et persiste jusqu'à 72 heures après l'arrêt du stimulus. Cette neutrophilie ne s'accompagne pas de l'apparition de GNN immatures dans le courant sanguin. Cependant, on assiste en parallèle à une lymphopénie modérée consécutive à la séquestration des lymphocytes dans les tissus lymphoïdes. En définitive, au lieu d'augmenter, le nombre de leucocytes totaux a plutôt tendance à diminuer ; le seul fait marquant est une inversion du rapport Neutrophiles : Lymphocytes (*Jain 1993*).

Les effets des corticoïdes ont été mesurés expérimentalement (*Paape 1977*). Une injection de 200 UI d'adrénocorticotropine est suivie d'une augmentation significative de la concentration en glucocorticoïdes en 15 minutes. Deux heures plus tard, une leucocytose, essentiellement composée d'une neutrophilie, est observée. Les glucocorticoïdes inhibent l'expression de certaines molécules d'adhésion exprimées à la membrane externe des GNN (les L-sélectines et CD18) (*Burton 1995*). La démarginalisation des neutrophiles qui en découle entraîne une neutrophilie composée uniquement de GNN matures.

## 1.2. Morphologie du neutrophile bovin

### 1.2.1. Le neutrophile bovin mature

Les GNN matures des bovins sont des cellules sphériques d'environ 12  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ils sont reconnaissables en microscopie optique grâce à leur noyau polymorphe lobulé (Photo 1). La chromatine est condensée et segmentée. Cette lobulation permettrait au neutrophile d'aplatir son noyau, et faciliterait ainsi la migration rapide du GNN entre les cellules endothéliales lors du phénomène de diapédèse.



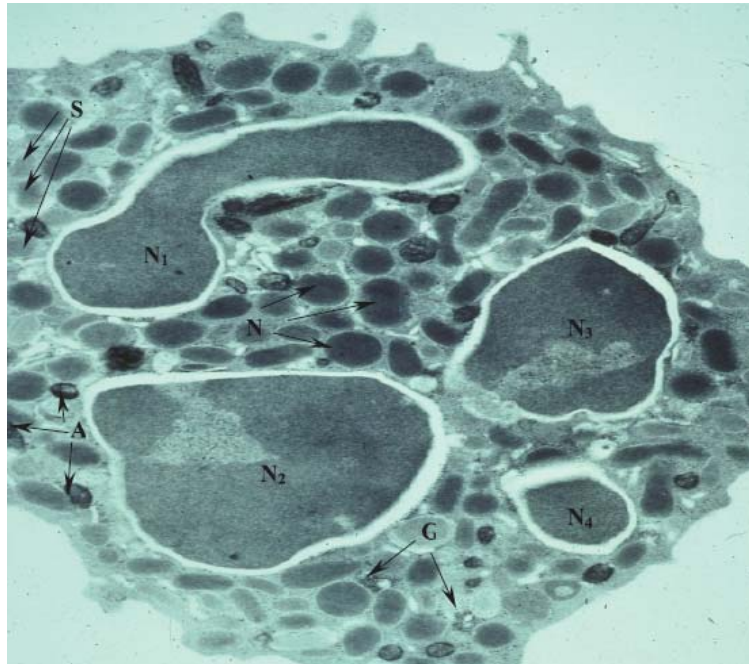
**Photo 1** : Vue en microscopie optique (grossissement x 1250) de neutrophiles bovins matures après coloration de Wright (Paape 2003)

Les flèches montrent des neutrophiles matures, dont on voit bien la segmentation du noyau.

En microscopie électronique à transmission (Photo 2), on distingue en plus des lobes du noyau (N1 à N4) de nombreux granules cytoplasmiques (cf. légende de la photo 2).

Ces nombreux granules ont valu aux globules blancs qui en possèdent (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) le qualificatif de « granulocytes ».

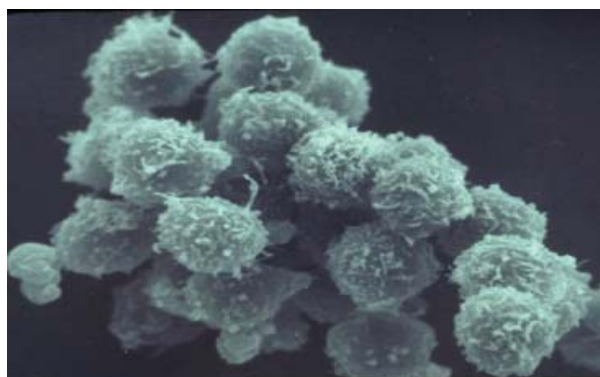




**Photo 2** : Vue en microscopie électronique à transmission (grossissement x 15000) d'un GNN bovin mature  
(Paape 2003)

Légende : N1 à N4 = noyau plurilobé, G = granules de glycogène, S = granules spécifiques, A = granulations primaires azurophiles, N = granulations peroxydase négatifs.

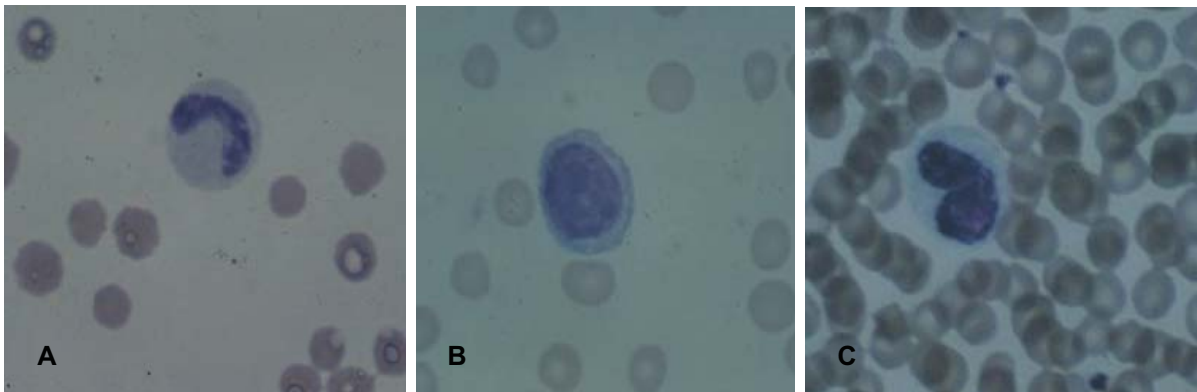
En microscopie électronique à balayage (photo 3), les GNN apparaissent sphériques avec des pseudopodes faisant saillie, créant des creux à leur surface. Cela confère une grande surface membranaire aux neutrophiles, particularité essentielle pour ingérer les particules lors du processus de phagocytose.



**Photo 3** : Vue en microscopie électronique à balayage (grossissement x 2500) de leucocytes bovins  
(Paape 2003)

### 1.2.2. Autres caractères morphologiques des neutrophiles sanguins

Les GNN immatures, produits dans la moelle osseuse, sont par ordre de différenciation les myélocytes, métamyélocytes, et les neutrophiles non segmentés ou « band cells » (Photos 4A, 4B et 4C). Dans certaines conditions, ces derniers peuvent être présents dans le sang ; dans ce cas, la courbe d'Arneth, représentant le nombre de GNN en fonction de la lobulation nucléaire, est déviée à gauche car les jeunes neutrophiles ont un noyau moins segmenté et contiennent donc moins de lobes.



**Photos 4 A, B et C :** Vues en microscopie optique (grossissement x 1250) de GNN bovins immatures après coloration de Wright (Paape 2003)

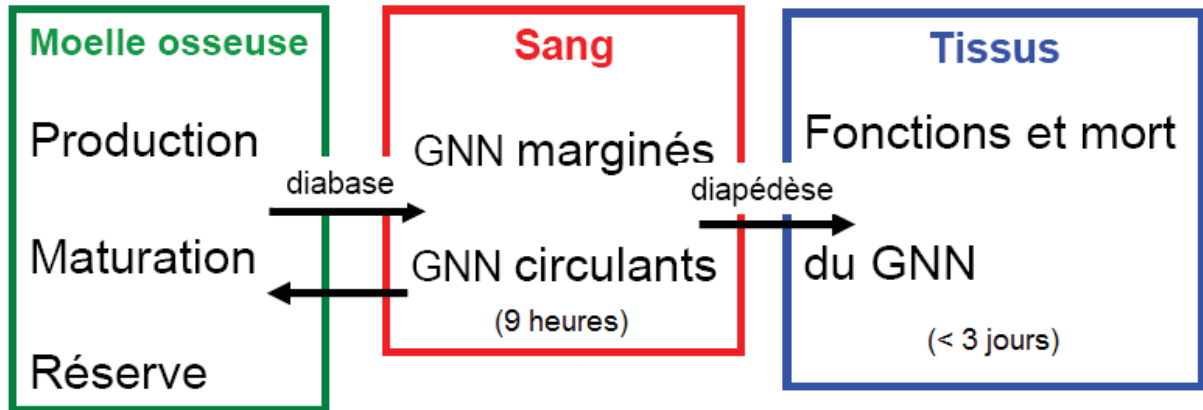
(A) : GNN sanguin au stade band cell ; forme typique du noyau en fer à cheval. (B) : GNN sanguin au stade myélocyte ; le noyau est grand et sphérique ; la morphologie est semblable à celle d'un lymphocyte. (C) GNN sanguin au stade métamyélocyte ; noyau en forme de haricot.

Dans un contexte inflammatoire, lorsque la mobilisation du stock de GNN matures depuis la moelle osseuse ne suffit pas, il est fréquent de retrouver des band cells, voire des myélocytes et métamyélocytes dans le sang (John W. Harvey 2001).

Lors d'endotoxémie, en plus des neutrophiles immatures, il est possible de retrouver des GNN apoptotiques dans le sang, dont le noyau a une apparence inhabituelle.

### 1.3. Cycle de vie d'un granulocyte neutrophile

Trois phases se succèdent au cours de la vie d'un GNN : phase intramédullaire, phase circulatoire et phase tissulaire (figure 1).



**Figure 1 :** Les différents compartiments des GNN dans l'organisme (d'après Bourgès-Abella 2008)

Au cours de la première phase se produit la différenciation de cellules souches en GNN matures, prêts à migrer dans le sang en réponse à une situation infectieuse par exemple. Ensuite, le neutrophile quittera le courant circulatoire en passant entre les cellules endothéliales des vaisseaux pour migrer dans les tissus jusqu'au site de l'inflammation ou de l'infection.

Le cycle de vie d'un GNN est relativement court par rapport aux autres cellules sanguines puisqu'il est d'environ 7 à 10 jours.

#### 1.3.1. Origine des GNN

La synthèse des GNN fait partie du processus général de l'hématopoïèse. C'est un ensemble de phénomènes qui dure toute la vie de l'individu, et dont le but est de synthétiser des cellules différenciées qui vont gagner la circulation. Après la naissance, l'hématopoïèse se déroule dans la moelle osseuse rouge. Une cellule souche multipotente va subir un processus mixte associant une multiplication et une maturation progressive et continue (Bourgès-Abella 2008).

La cellule souche de la lignée des neutrophiles va donner naissance successivement à une cellule souche myéloïde, à un progéniteur mixte des granulocytes et des monocytes – macrophages (CFU-GM), puis à un progéniteur de la lignée granuleuse qui se transforme en

myéloblaste, puis en promyélocyte et en myélocyte (*Jain 1993*). Le neutrophile acquiert alors progressivement des marqueurs membranaires de différenciation (**CD** = classe de différenciation).

La maturation du GNN, consiste en l'apparition successive :

- dans les promyélocytes : des granulations primaires azurophiles
- dans les myélocytes : des granulations secondaires spécifiques qui définissent le type de granulocyte (ici neutrophile, car ces granules restent neutres en coloration de May Grünwald-Giemsa)
- en fin de maturation : des vésicules sécrétoires.

Pour les neutrophiles, la granulopoïèse dure en moyenne 5,77 jours chez le veau (*Valli 1971*).

Le GNN mature est prêt à quitter la moelle osseuse. Le phénomène de passage du compartiment granulopoïétique de la moelle osseuse vers le sinus veineux est appelé diabase (*diabaten* : qui passe à travers). Le lieu de passage entre le système hématopoïétique et le système vasculaire est composé de capillaires sinusoides, constituant la barrière médullo-sanguine. Les neutrophiles traversent une paroi trilaminaire :

- une couche luminale constituée de l'endothélium linéaire des capillaires, qui forme une barrière sélective entre la moelle osseuse et le sang : les GNN doivent passer à proximité des zones jonctionnelles par des orifices de 2 à 3  $\mu\text{m}$
- 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 leur déformabilité et leur capacité de mobilité.

Chez le veau, la différenciation du neutrophile suivie de la diabase s'étendent sur 7 jours en moyenne (*Valli 1971*).

Les neutrophiles matures arrivent alors dans le courant circulatoire, dans lequel ils circulent peu de temps puisque le temps de demi-vie est de 8,9 heures (*Carlson 1975*). Durant ce court laps de temps, soit ils sont recrutés dans les tissus, soit ils meurent et sont éliminés dans la rate ou le foie.

### 1.3.2. Une mort cellulaire programmée

Dans les conditions physiologiques, les neutrophiles qui n'ont pas été recrutés dans les tissus meurent par apoptose. Il s'agit d'un processus de mort cellulaire programmée, correspondant à une sorte de stade ultime de différenciation, à distinguer de la nécrose. L'apoptose se caractérise par une condensation de la chromatine, une fragmentation du noyau et un rétrécissement cellulaire (*Reed 2000*). Le GNN apoptotique est fragmenté puis phagocyté par des macrophages et des cellules dendritiques grâce à l'expression membranaire de récepteurs spécifiques (*Whyte 1993*).

Ainsi l'apoptose joue un rôle clé dans la résolution de la réponse inflammatoire, car elle évite le déversement du contenu protéolytique qui endommagerait les cellules et tissus environnants. Elle permet de réguler le nombre de GNN circulants et d'assurer ainsi l'homéostasie.

Certains anti-infectieux sont capables d'induire l'apoptose. Ainsi certains antibiotiques ont des propriétés anti-infectieuses et anti-inflammatoires et sont fréquemment utilisés dans le cas d'affections respiratoires dont la pathogénèse résulte à la fois de la virulence des bactéries et de la réponse inflammatoire. C'est le cas des macrolides qui sont reconnus comme immuno-modulateurs sans affecter les propriétés antibactériennes des neutrophiles (*Koch 2000*). Les mécanismes moléculaires demeurent flous. La tilmicosine agirait via un facteur de transcription (NF $\kappa$ B) régulant l'apoptose (*Buret 2010*) ; la tulathromycine réduirait l'accumulation de LTB<sub>4</sub> sur le site inflammatoire (*Fischer 2011*).

En tant que principale barrière de défense de la glande mammaire, les neutrophiles sont essentiels dans l'élimination d'un agent infectieux responsable de mammite. Toutefois une exposition prolongée de la mamelle aux GNN peut endommager l'épithélium sécrétoire (*Capuco 1986*) et provoquer ainsi une diminution de la production lactée (*Sordillo 1989*). Ceci est d'autant plus vrai au cours des deux semaines suivant le part, période pendant laquelle les GNN sont moins sensibles à l'apoptose. C'est probablement une des raisons pour laquelle les mammites sont plus sévères en début de lactation (*Burvenish 1994*).

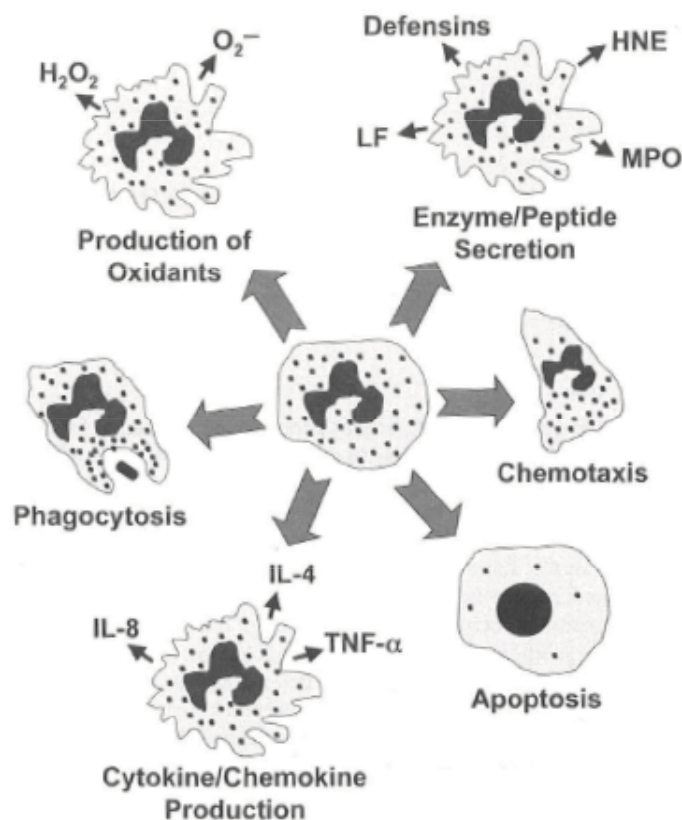
Le mécanisme d'apoptose est régulé par différents facteurs, chimiques (cytokines) ou physiques (interactions cellulaires).

Ainsi l'interleukine 8 (**IL-8**) ou l'interféron- $\gamma$  (**IFN $\gamma$** ) prolongent la durée de vie des neutrophiles humains. A l'inverse, le **TNF $\alpha$**  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) induit l'apoptose des GNN humains et bovins, selon un processus bien décrit (*Paape 2003*). Le lipopolysaccharide (**LPS**), composant de la membrane des bactéries Gram négatif, semble lui aussi inhiber l'apoptose directement, bien que le mécanisme d'action n'ait pas été clairement établi (*Hachiya 1995*).

Les processus d'adhésion et de migration des GNN influencent aussi l'apoptose, comme par exemple la composition de la matrice extracellulaire et le type de cellules auxquelles les neutrophiles adhèrent. Le rôle des  $\beta$ -2 intégrines comme CD11b (molécules d'adhésion exprimées à la surface des GNN) a notamment été prouvé (*Coxon 1996*).

## 2. Fonctions des granulocytes neutrophiles

Les neutrophiles sont des cellules essentielles à la défense de l'organisme et polyvalentes. Effecteurs précoces de la lutte contre les infections, ils jouent un rôle central dans la médiation et la résolution de l'inflammation, et sont de véritables messagers entre l'immunité spontanée et l'immunité spécifique grâce à la synthèse de chimiokines. Leurs fonctions cellulaires (mobilité, chimiotaxie, adhésion, phagocytose, dégranulation, production de radicaux libres de l'oxygène, apoptose) sont schématisées dans la figure 2.



**Figure 2** : Schéma récapitulatif des fonctions du neutrophile humain mature (Malech 2007)

Légende : HNE : Human Neutrophil Elastase ; IL(-4, -8) : interleukine(-4, -8) ; LF : Lactoferrine ;

MPO : myeloperoxydase ; TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

Dans le sang, les neutrophiles matures sont dans un statut de repos physiologique. Ils attendent de recevoir différents stimuli provenant d'un foyer infectieux ou inflammatoire pour quitter le compartiment sanguin. Sous leur influence, les GNN adhèrent aux cellules endothéliales des vaisseaux pour se glisser entre celles-ci : c'est la diapédèse. Guidés par des molécules spécifiques, ils vont ensuite se diriger vers le foyer de l'inflammation (chimiotactisme). Une fois le contact et la reconnaissance établis, le neutrophile va

phagocyter des particules de grande taille comme les bactéries. Ensuite, son activation va entraîner la dégranulation et la formation de puissantes formes réactives de l'oxygène (**FRO**) dans le phagosome afin de tuer l'agent pathogène phagocyté (bactéricidie). En parallèle, le GNN activé va produire des cytokines, molécules qui jouent le rôle de messagers à destination des autres effecteurs de la réponse immunitaire. La durée de vie tissulaire d'un GNN ne dépasse pas 3 jours (*Malech 2007*).

## **2.1. Chimiotactisme**

### **2.1.1. Principe**

L'invasion de l'organisme par des germes pathogènes déclenche une inflammation, procédé fondamental à l'origine du recrutement de cellules et de molécules de défense au sein du foyer infectieux. Les neutrophiles vont migrer vers le site inflammatoire grâce aux signaux chimiques envoyés par les cellules sentinelles (cellules dendritiques, macrophages, mastocytes qui patrouillent dans les tissus), par des cellules non immunitaires (cellules épithéliales) ou directement par les agents infectieux.

### **2.1.2. Les signaux chimiotactiques**

Le LPS des bactéries Gram négatif, certains composants du système du complément (C5a et C3a), les cytokines IL-1, -2 et -8, le leucotriène B4 (LB4) sont parmi les chimioattractants les plus puissants (*Persson 1993*).

#### **2.1.2.1. *Le système du complément***

##### **i. Définition**

Le système du complément correspond à un ensemble d'enzymes et de protéines sanguines. Synthétisées par le foie, elles sont présentes dans le sang sous une forme inactive. Lors d'une infection, des activations en cascade se produisent et aboutissent à la formation



d'un complexe moléculaire dit complexe d'attaque membranaire du complément (**CAMC**) qui va entraîner la lyse bactérienne ou virale (virus enveloppés).

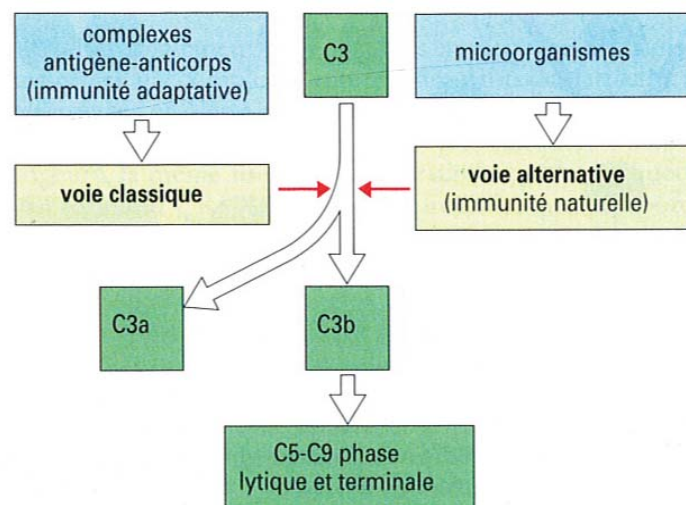
## ii. Mécanisme d'action

Le complément peut être activé selon trois voies (*Euzéby 2007*), conduisant toutes à la formation de CAMC (voir figure 3) :

- la voie classique, appartenant au système immunitaire spécifique, dont le facteur déclenchant est le complexe Antigène/Anticorps
- la voie des lectines, appartenant au système immunitaire non spécifique, déclenchée par la fixation d'une lectine sur des sucres de la paroi bactérienne (souvent mannose)
- la voie alterne, dépendante du système immunitaire non spécifique.

La voie des lectines conduit au clivage de la protéine C3 en C3a et C3b.

La protéine C3b, également issue de l'hydrolyse permanente de C3, peut se fixer à une surface activatrice de la voie alterne (bactéries, levures, parasites).



**Figure 3** : Comparaison des voies classique et alterne du complément (*d'après Roitt et al 2001*)

Les deux voies génèrent une C3-convertase qui fragmente C3 en C3b, événement central de l'activation du complément. A son tour, C3b active la phase lytique et terminale, C5b-C9 qui correspond au CAMC.

La protéine C3 est clivée en C3a et C3b. Le fragment C3b, à la fois produit et élément déclenchant de la voie alterne, est clivé en iC3b et C3d. Ces fragments se fixent à la surface des pathogènes et sont reconnus par le complexe CD11b/CD18 ou **CR3** exprimés à la surface des monocytes, des macrophages et des neutrophiles.

### iii. Propriétés biologiques

Outre son action bactéricide, le complément possède d'autres propriétés biologiques. La fixation des fragments du complément aux Ag et aux récepteurs du complément (**CR**) exprimés à la surface des cellules immunitaires permettent la stimulation de la synthèse d'immunoglobulines (**Ig**) par les lymphocytes B, l'opsonisation, la médiation de l'inflammation, etc.

Le C3a est une anaphylatoxine qui stimule avec le C5a la dégranulation des mastocytes et des éosinophiles, ainsi que la libération de molécules vasoactives (histamine, sérotonine) par les plaquettes (*Tizard 2004*). Ces molécules augmentent la perméabilité des vaisseaux et facilite la diapédèse des neutrophiles et des monocytes.

Le C5a est capable d'agir sur les neutrophiles en provoquant la libération des granules contenant des protéases afin de détruire l'Ag. Le C5a agit aussi sur les monocytes et les macrophages en provoquant l'excrétion de médiateurs de l'inflammation (IL-1 et IL-6). Il augmente aussi l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (*Gerard 1991, Gerard 1994*).

#### 2.1.2.2. *Les médiateurs lipidiques*

Les prostaglandines, dérivant de l'acide arachidonique, sont des lipides libérés dans les tissus endommagés par l'inflammation. Le leukotriène B<sub>4</sub> (**LTB<sub>4</sub>**) est une prostaglandine qui a un puissant pouvoir chimiotactique pour les neutrophiles et les monocytes/macrophages (*Palmer 1980*). Il augmente la capacité de phagocytose des macrophages (*Manusco 1998, Wirth 1985*) et des neutrophiles, via les récepteurs du complément (*Manusco 2001*).

Le « Platelets-Activating-Factor » (**PAF** ou Protéine Activatrice des Plaquettes) est un phospholipide qui stimule l'agrégation plaquettaire. Produit par les plaquettes et les cellules endothéliales, il a aussi une fonction activatrice et chimioattractante des neutrophiles (*Camussi 1993, Mc Intyre 1986*). Le PAF entraîne une polarisation de la cellule, augmente l'adhésion et la motilité, provoque une mobilisation de calcium intracellulaire et la dégranulation (*Ingraham 1982*).

### 2.1.2.3. *Les molécules bactériennes*

Le LPS reconnu par les cellules sentinelles entraîne la libération de nombreux signaux chimioattractants de la part des cellules endothéliales et des cellules épithéliales (*Wright 1990*).

Les bactéries qui pénètrent dans l'organisme synthétisent des di- et tri- peptides formylés. L'un d'entre eux, la formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (**fLMP**), a une puissante action chimioattractante sur les neutrophiles et les monocytes.

### 2.1.2.4. *Les chimiokines*

Les cytokines sont des molécules impliquées dans la communication intercellulaire durant la réponse immunitaire. Les chimiokines sont une famille de cytokines qui exercent une activité chimiotactique sur les neutrophiles ou les macrophages. Elles peuvent aussi déclencher chez les cellules cibles des fonctions particulières. Les chimiokines se répartissent en quatre familles qui se distinguent par la distance séparant les deux résidus cystéine (C) conservés (séquences CC pour les  $\alpha$ , CXC pour les  $\beta$ ). Elles agissent par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques (nommés CCR ou CXCR) dont les segments membranaires sont liés au GTP (protéines G) qui transduisent le signal d'activation cellulaire.

Le TNF- $\alpha$  est synthétisé très tôt par les macrophages lors du processus inflammatoire. Il agit sur les macrophages et les cellules endothéliales pour la synthèse d'IL-1. Il active les neutrophiles, afin qu'ils adhèrent plus facilement à l'endothélium et s'appêtent à jouer leur rôle bactéricide. Combiné à l'IL-1, il va ensuite augmenter l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales de la paroi vasculaire favorisant l'adhésion ferme des neutrophiles et leur transmigration. A faible dose, le TNF- $\alpha$  est responsable localement de réactions algiques, de rougeur, de raideur musculaire. Associé à l'IL-1 et lors des infections sévères, il peut agir sur le cerveau et causer un syndrome fébrile : fièvre, malaise, léthargie, et baisse de l'appétit (*Tizard 2004*).

L'IL-8, ou CXCL8, est produite par l'activation des macrophages. Elle est synthétisée par les monocytes, les lymphocytes T, les neutrophiles, les cellules Natural Killer, les cellules endothéliales et épithéliales, et les fibroblastes. Sa fixation aux récepteurs CXCR1 et CXCR2 va guider et activer les GNN. Tout comme le LTB<sub>4</sub>, le C5a et le fMLP, 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*).

#### **2.1.2.5. *Autres signaux chimiotactiques***

Des molécules qui ne sont pas secrétées par des cellules de l'organisme ou par les bactéries peuvent avoir un effet chimiotactique. C'est le cas de certains produits de la réaction inflammatoire, comme le fibrinopeptide B, qui est un produit de dégradation du fibrinogène.

#### **2.1.3. Bilan du rôle des neutrophiles**

Les neutrophiles jouent un rôle fondamental dans l'activation et la phase effectrice de la réaction immunitaire.

Les molécules qui diffusent depuis le site de l'infection forment un gradient de concentration. Les cellules se déplacent grâce à des lamellipodes dont la formation est guidée par les concentrations les plus élevées de molécules chimioattractantes.

Les neutrophiles sont capables d'exprimer des gènes dont les produits (cytokines) sont impliqués dans la réponse immunitaire. Ils disposent aussi de récepteurs spécifiques de cytokines dites proinflammatoires. Ainsi le GNN a un rôle complexe puisque les signaux qu'il émet sont destinés non seulement à la cellule elle-même, mais aussi à d'autres neutrophiles et à d'autres cellules immunitaires. Ainsi, le rôle des GNN dans la communication entre les cellules immunitaires est essentiel au début des réponses inflammatoire et immunitaire vis-à-vis des bactéries.

Présents sur le site de l'infection, les neutrophiles vont produire des cytokines, comme l'IL-8, qui vont recruter d'autres GNN. Après migration, ces neutrophiles activés vont à leur tour synthétiser d'autres molécules signaux comme le TNF- $\alpha$  et l'IFN $\gamma$  afin de recruter et activer d'autres populations de cellules immunitaires.

Les neutrophiles communiquent donc entre eux, afin de réguler leur propre population et leurs fonctions effectrices sur le site infectieux : ils induisent le recrutement tissulaire, l'apoptose et le passage, de la moelle osseuse vers le sang. Enfin, ils émettent et reçoivent des signaux pour et par les autres effecteurs du système immunitaire, notamment ceux appartenant à l'immunité spécifique.

## 2.1.4. Migration guidée par les molécules chimiotactiques

### 2.1.4.1. Les récepteurs impliqués dans l'attachement des neutrophiles aux cellules endothéliales

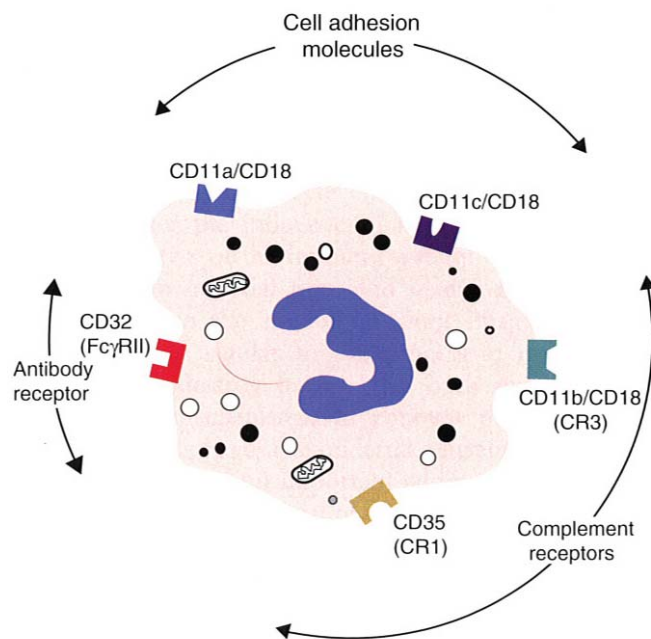
Les neutrophiles sont les premières cellules à quitter le compartiment sanguin en cas d'infection. Dans le tissu inflammatoire, le GNN circulant va devoir adhérer à la paroi des vaisseaux sanguins et traverser l'endothélium afin de migrer jusqu'au foyer infectieux.

La migration des neutrophiles est permise par la reconnaissance entre :

- d'une part les molécules chimiotactiques, puis les molécules d'adhésion exprimées à la surface de l'endothélium
- d'autre part les récepteurs membranaires des GNN.

Les récepteurs exprimés à la surface des cellules immunitaires sont le plus souvent des glycoprotéines. Ces molécules sont classées dans un système de classe de différenciation (**CD**). Parmi plus de 300 molécules qui ont déjà été identifiées, trois types sont importants dans les mécanismes d'adhésion des neutrophiles (figure 4) :

- les récepteurs des fragments constants (**Fc**) des immunoglobulines (CD32 = Fc $\gamma$ RII)
- les récepteurs du complément (CD35 = CR1 et CD11b/CD18 = CR3)
- les molécules d'adhésion cellulaire (CD11a/CD18 et CD11c/CD18) (Tizard 2004).



**Figure 4 :** Principaux récepteurs membranaires des neutrophiles (d'après Tizard 2004)

D'autres récepteurs des GNN sont impliqués dans les mécanismes d'élimination des pathogènes.

Par exemple, la molécule CD14 membranaire (**mCD14**) est un récepteur qui a été identifié sur les neutrophiles, les monocytes et les macrophages bovins (*Paape 1996*). Le ligand du LPS, le LPS Binding Protein (**LBP**) forme avec le LPS un complexe reconnu par mCD14. La liaison (LPS-LBP) – mCD14 entraîne la libération de TNF- $\alpha$ , et le clivage du mCD14 dont un des produits est le CD14 soluble (**sCD14**). Le sCD14 interagit avec le LPS bactérien ; le complexe ainsi formé va se fixer sur le récepteur **TLR-4** (Toll-like Receptor 4) des cellules endothéliales et des cellules épithéliales qui vont libérer des chimiokines (*Paape 2003*).

#### **2.1.4.2. Adhésion à l'endothélium**

L'étape préalable à la diapédèse est l'adhésion ferme du neutrophile à l'endothélium vasculaire. Le processus est contrôlé par les molécules de signalisation exprimées à la surface de l'endothélium. Il se déroule surtout dans les veinules, où la force hémodynamique de cisaillement est faible, ce qui laisse le temps aux GNN de réagir aux signaux chimiotactiques et permet l'interaction efficace entre molécules d'adhésion exprimées par les deux types cellulaires.

Le mécanisme de base suit un modèle en 3 étapes (voir figure 5) :

- ralentissement des neutrophiles qui se mettent à rouler sur la paroi endothéliale avant de s'arrêter : étape du « rolling »
- réponse des neutrophiles à l'arrêt aux différentes chimiokines : activation
- augmentation de l'affinité des intégrines leucocytaires qui s'attachent fermement aux molécules complémentaires présentes à la surface de l'endothélium avant la diapédèse proprement dite (*Roitt 2001*).

**Figure 5 : 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, à l'origine du « rolling ». Les intégrines les accrochent ensuite à l'endothélium par des liaisons fortes : le GNN est à l'arrêt absolu, Puis les GNN traversent la barrière endothéliale (*d'après Tizard 2004*).

**i. Première étape : liaison des sélectines**

L'expression des molécules d'adhésion à la surface cellulaire est conditionnée par différents produits bactériens (tels que le LPS) ou par des molécules produites par les tissus endommagés (TNF- $\alpha$ , IL-1). Ces stimuli entraînent l'expression de glycoprotéines, les P-sélectines (CD62P, P comme plaquette) à la surface des cellules endothéliales suite à la dégranulation de vésicules cytoplasmiques. Ces P-sélectines se lient à des chaînes d'hydrates de carbone d'une molécule exprimée à la surface des GNN circulants, les L-sélectines (CD62L) (L comme leucocyte). D'autres sélectines interviennent dans la liaison entre GNN et endothélium : les E-sélectines (E comme endothélium) qui se lient à des glycoprotéines des neutrophiles.

Ces liaisons sont de faible affinité. Elles permettent une capture des GNN à la surface de l'endothélium et une réduction progressive de leur vitesse de déplacement. Le GNN roule alors sur la paroi endothéliale, d'où le qualificatif de « rolling » (figure 5), jusqu'à un éventuel arrêt.

## **ii. Deuxième étape : activation des neutrophiles grâce aux signaux chimiotactiques**

Les chimiokines libérées depuis le site inflammatoire vont se fixer à deux niveaux :

- leur récepteur spécifique exprimé à la surface cellulaire ; par exemple celle des neutrophiles qui expriment CXCR1 et CXCR2, récepteur de l'IL-8 et qui leur permettent de répondre spécifiquement à sa présence.
- aux protéoglycanes, afin qu'elles restent présentes à la surface luminale de l'endothélium (côté sanguin), et être ainsi disponibles pour agir sur les leucocytes ralentis par les sélectines.

En présence de facteurs chimiotactiques, le nombre et l'affinité des molécules d'adhésion exprimées à la surface des neutrophiles vont être modifiés.

Ainsi, en présence de C5a ou de LTB<sub>4</sub>, l'expression de CR3 (CD11b/CD18), et p150-95 (CD11c/CD18) est très augmentée à la surface des GNN (*Cavaillon 1996*).

## **iii. Troisième étape : adhésion des intégrines neutrophiliques aux récepteurs endothéliaux**

Les intégrines constituent un groupe majeur de molécules d'adhésion présentes notamment à la surface des neutrophiles et capables de se lier à un ou plusieurs ligands, nommés **CAM** (Molécules d'Adhérence Cellulaire). Les intégrines sont constituées de deux chaînes protéiques,  $\alpha$  et  $\beta$ , liées entre elles. Il existe 3 types de chaînes  $\alpha$  (CD11a, b et c) et une seule chaîne  $\beta$ 2 (CD18) dans le cas des GNN.

L'activation des neutrophiles soutient le processus d'adhésion aux intégrines de deux manières :

- libération d'intégrines stockées dans la cellule (augmentation quantitative de l'expression)
- et/ou regroupement sous forme d'ilots en surface des cellules, ce qui augmente l'avidité des ensembles formés.

Différents facteurs entraînent l'attachement ferme des GNN aux cellules endothéliales. Une activation cellulaire est nécessaire pour que le récepteur ait une affinité suffisante pour son ligand et pour lui permettre d'adhérer.



Le TNF- $\alpha$ , l'IFN $\gamma$  et l'IL-1 augmentent l'expression de la molécule LFA-1 (CD11a/CD18) dont les ligands sont les molécules d'adhésion intercellulaire-1 et -2 (**ICAM-1 et -2**) (*Cavaillon 1996*).

Le récepteur CD11b/CD18, fortement exprimé sous l'effet de ces cytokines, permet l'attache du GNN à l'endothélium par sa liaison avec d'autres molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules endothéliales activées, comme ICAM-1 (*Ross 2002*).

L'affinité entre CR3 et ICAM-1 est augmentée par l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales par l'intermédiaire des E-sélectines.

Le PAF sécrété par les cellules endothéliales active le « rolling » puis augmente l'expression de CD11a/CD18 à la surface du neutrophile ainsi que son affinité pour son ligand endothélial CD102 (ICAM-2).

Une fois que le GNN est à l'arrêt, activé et fermement lié à la paroi vasculaire grâce aux intégrines, le processus de diapédèse peut débuter.

#### **2.1.4.3. Transmigration des neutrophiles**

Les GNN fixés à l'endothélium vasculaire migrent vers les tissus à travers les jonctions cellulaires endothéliales. La migration est déclenchée par les signaux cytokiniques, puis guidée par des signaux chimiotactiques.

Les mécanismes précis concernant le rôle des récepteurs d'adhésion et des cytokines sur le déroulement de la transmigration demeurent flous. D'après May (1992), la transmigration ne serait induite que par les facteurs TNF- $\alpha$  et l'IFN $\gamma$ . Plus récemment, il a été montré que les récepteurs ICAM-2, **PECAM-2** (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) ou **JAM-A** (Junctional Adhesion Molecule) induiraient la transmigration des neutrophiles sous la dépendance de l'IL-1 mais pas du TNF- $\alpha$  (*Huang 2006*). Tous ces récepteurs agiraient de manière séquentielle dans l'induction de la transmigration (*Woodfin 2009*). JAM-1 et JAM-2, 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*).

Dans un modèle proposé par Kubes et al. (*Heit 2002*), l'IL-8 et le LTB<sub>4</sub> représentent des signaux intermédiaires : ils ne se retrouvent pas directement sur le site inflammatoire mais sont produits par des cellules de l'hôte pour attirer des cellules effectrices. Les agents terminaux, c'est-à-dire ceux retrouvés dans le site inflammatoire, sont représentés par le fMLP et le C5a. Les neutrophiles migrent préférentiellement vers les agents terminaux plutôt

que vers les agents intermédiaires. Le GNN est donc guidé par la présence de plusieurs agents chimiotactiques dans son environnement.

Le neutrophile se déplace dans la matrice extracellulaire en libérant des métalloprotéases et remonte ensuite le gradient de molécules chimiotactiques. Celles-ci se fixent sur des récepteurs à domaines transmembranaires couplés à des protéines G, ce qui induit 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 chimioattractantes : les récepteurs membranaires se concentrent en avant de la cellule, au niveau du lamellipode qui fait avancer la cellule par un système de polymérisation / dépolymérisation en suivant ce gradient.

## **2.2. Reconnaissance de l'agent pathogène**

Avant de phagocyter l'agent pathogène, le GNN doit le reconnaître et ainsi être activé. La communication cytokinique entre en jeu dans cette activation, associée à la reconnaissance de l'agent pathogène par le neutrophile.

### **2.2.1. Rôle des récepteurs Toll-like dans la reconnaissance**

Les récepteurs du type Toll ou Toll-like receptors (**TLR**) sont des récepteurs transmembranaires qui sont classés dans la famille des **PRR** (Pattern Recognition Receptors). Ils sont exprimés à la surface d'un grand nombre de types cellulaires différents dont les cellules sentinelles (cellules dendritiques, macrophages et mastocytes), et les neutrophiles (*Moller 2005*). Il en existe actuellement 11. Ils jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance des agents pathogènes et le déclenchement de l'inflammation. Ils appartiennent au système immunitaire spontané puisqu'ils reconnaissent des motifs conservés sur les pathogènes, appelés **PAMPs** (Pathogen Associated Molecular Pattern). Ainsi les TLR permettent la reconnaissance spécifique des pathogènes avant la mise en place de la réponse adaptative (*Werlhing 2003*).

Parmi les PAMPs, on retrouve entre autres le LPS des bactéries Gram-négatif, l'acide lipotéichoïque (**LTA**) des bactéries Gram-positif, l'ADN bactérien, et les glycolipides des mycobactéries.

La liaison de la partie extracellulaire du TLR au PAMP induit la transduction d'un signal à partir de la partie intracellulaire du récepteur, qui est à l'origine de l'activation du GNN (*Akira 2004*).

Différents TLRs vont induire la libération de différentes combinaisons de cytokines dont l'action sera fonction du ou des PAMPs reconnus. Ainsi le TLR4 est un médiateur de l'immunité spontanée et acquise : spécifique du LPS, leur liaison va engendrer de la part des macrophages et des cellules dendritiques la production de cytokines qui vont recruter des cellules immunitaires du système spécifique (*Tizard 2004*).

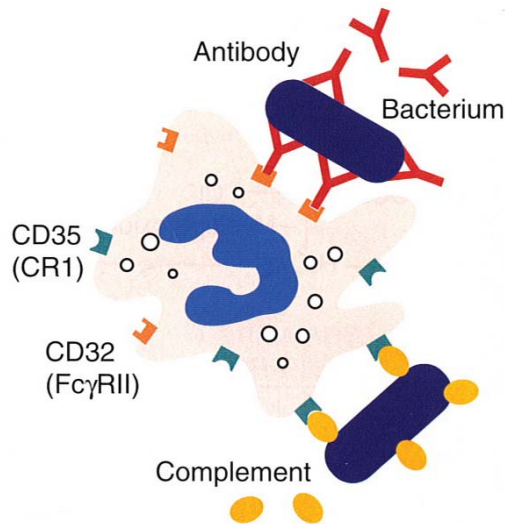
### 2.2.2. Oponisation

L'étape de la phagocytose est précédée de la reconnaissance et de l'établissement d'un contact étroit entre le neutrophile et la bactérie. Or leur adhésion ne se fait pas spontanément car les surfaces membranaires des bactéries et des GNN sont chargées négativement. L'opsonisation permet de faciliter à la fois la reconnaissance et l'adhésion entre leurs surfaces. Les opsonines sont des molécules chargées positivement qui vont neutraliser la charge électrique bactérienne.

Les opsonines les plus efficaces sont les immunoglobulines (**Ig**), dont le fragment Fab se lie spécifiquement aux épitopes de l'agent pathogène, et le fragment Fc se lie aux récepteurs Fc (**FcR**) des neutrophiles (*Paape 2003*). Les principales Ig d'opsonisation chez le bovin sont les IgM et les IgG<sub>2</sub> (*Miller 1988*). Les GNN bovins expriment un FcR spécifique des IgG<sub>2</sub>, le récepteur Fc<sub>γ</sub>2R (*Zhang 1995*) (voir figure 6).

Les protéines du complément dérivées du C3 sont elles aussi capables d'opsoniser les bactéries. Ainsi les fractions C3b et iC3b générées lors de l'activation du complément se déposent à la surface de l'agent et se lient aux récepteurs CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) du neutrophile (*Nagahata 1997*).

Les Ig jouent donc un rôle essentiel dans le déroulement de la réponse immunitaire spontanée grâce à leur fixation sur les bactéries, promouvant ainsi leur phagocytose.



**Figure 6** : Opsonisation des bactéries par des immunoglobulines et des molécules du complément (Tizard 2004).

Le FcR CD32 (Fc $\gamma$ RII) est remplacé chez les bovins par le Fc $\gamma$ 2R.

Le contact entre la bactérie et le GNN est difficile dans la circulation sanguine. Sans opsonisation, le contact est tout de même possible lorsque l'agent pathogène est logé dans les tissus, ou fixé à la membrane plasmique d'une cellule quelle qu'elle soit, ce qui réduit la phase de suspension dans le sang. L'ingestion est alors facilitée : c'est la phagocytose de surface.

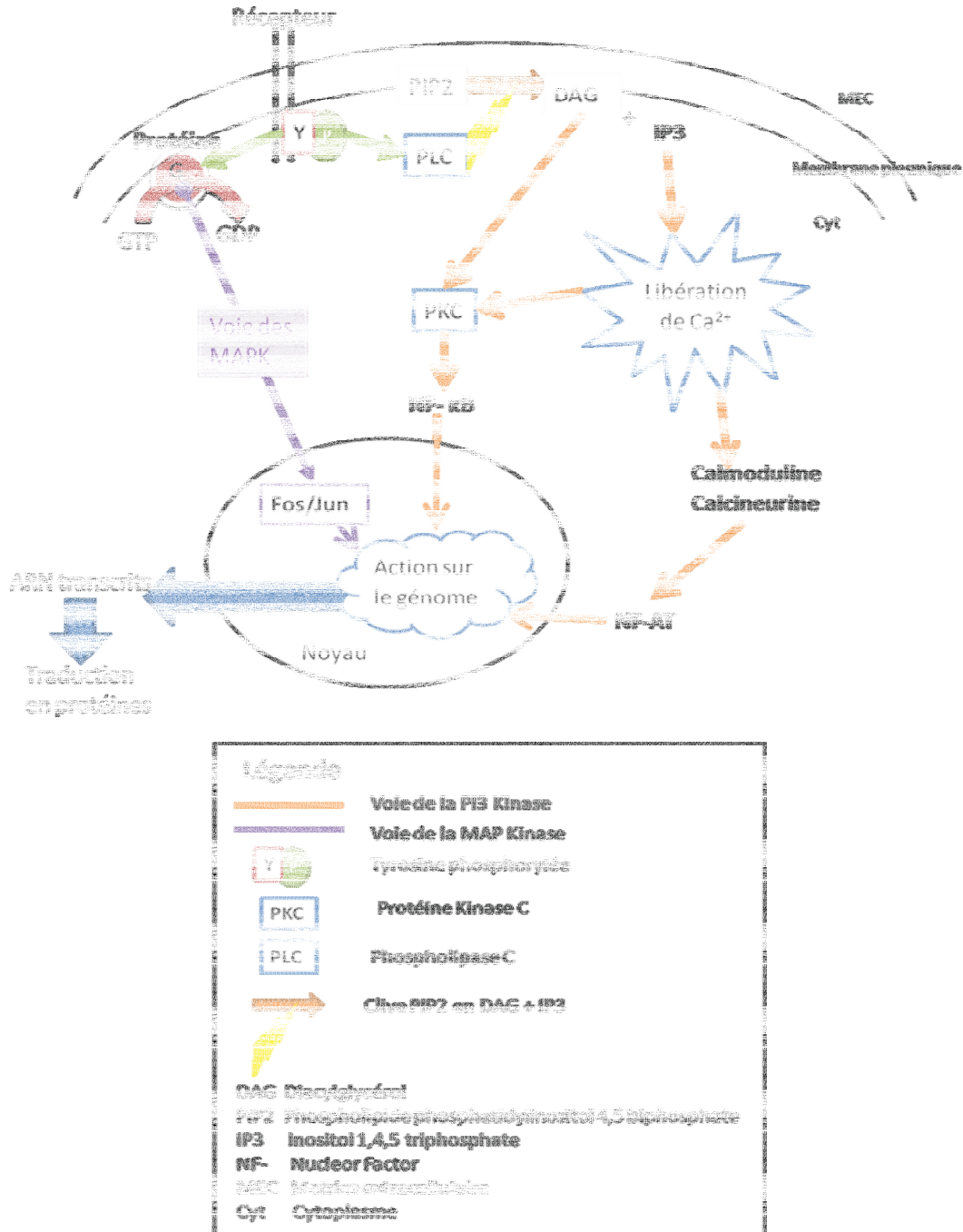
### 2.2.3. Reconnaissance non immunologique

Il existe une reconnaissance ne faisant pas appel aux effecteurs de l'immunité qui s'applique à certains types d'Ag. Cette reconnaissance non immunologique fait intervenir des lectines et les propriétés hydrophobes des surfaces cellulaires. Ainsi les récepteurs aux lectines/carbohydrates de la surface membranaire des GNN bovins peuvent interagir avec les pilis riches en carbohydrates d'*E. coli* en l'absence d'opsonines (Paape 1996).

### 2.2.4. Les cascades d'activation du granulocyte neutrophile : synthèse

La reconnaissance du microorganisme via les TLR ou les FcR induit l'activation du neutrophile grâce à la transduction d'un signal qui génère un message intracellulaire. Selon le récepteur impliqué, la cascade d'activation sera différente, ce qui va moduler l'action du GNN. Les trois voies d'activation les plus étudiées sont :

- la voie des MAP kinases (**MAPK**)
- la voie de la protéine Kinase C (**PKC**)
- la voie d'activation via les TLR.



**Figure 7 :** Voies de la Phosphatidyl-inositol -3 Kinase (Pi3-K) et voie de la MAP Kinase (d'après Akira 2004)

La liaison d'un agoniste au récepteur active une tyrosine kinase qui phosphoryle les tyrosines de la chaîne intracellulaire du récepteur. C'est le point de départ de plusieurs voies de signalisation.

La liaison d'un agoniste à un récepteur active une tyrosine kinase qui phosphoryle les tyrosines de la chaîne intracellulaire du récepteur. C'est le point de départ de plusieurs voies de signalisation.

Par exemple, les particules de zymozan opsonisées (**OZP**) par liaison avec des Ac et des particules du complément permettent de mimer la reconnaissance (au niveau des récepteurs CD32) d'un agent pathogène opsonisé par le GNN. Les récepteurs Fc sont associés à des séquences **ITAM** (Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif), qui activent une tyrosine kinase. La phosphorylation des tyrosines sur le récepteur entraîne une cascade de réactions de phosphorylation qui aboutit à l'activation ou à la répression de gènes (*Akira 2004*).

*In vitro*, le PMA (Phorbol Myristate Acetate) est une molécule utilisée pour activer les neutrophiles. Cette molécule diffuse à travers la membrane plasmique du GNN, et active l'assemblage de la NADPH oxydase via la voie des PKC (*Karlsson 2000*).

**Encadré 1** : L'importance des protéines membranaires dans la réponse immunitaire :  
exemple de CD62L et CD11b/CD18.

### **La L-sélectine (CD62L)**

La L-sélectine CD62L est une molécule exprimée à la surface des leucocytes, notamment celle des neutrophiles circulants. Un GNN activé va exprimer davantage de CD62L par dégranulation de vacuoles cytoplasmiques.

Les L-sélectines ont un rôle crucial dans les mécanismes de défense. Quand elles se lient à leurs ligands, les neutrophiles circulants sont ralentis (liaisons de faible affinité). Pendant ce temps, le GNN reçoit les signaux de migration provenant de l'endothélium. Cette étape de rolling est en fait un processus d'intégration des signaux, à l'origine de l'activation du neutrophile. Activé, il va pouvoir adhérer fermement à l'endothélium et entamer sa transmigration.

### **Le complexe CD11b/CD18 (CR3)**

Le CD11b/CD18 (ou CR3) a un rôle primordial dans la réponse spontanée à une infection.

Tout d'abord, il permet par son interaction avec ICAM-1 l'adhésion ferme à l'endothélium vasculaire en regard duquel se situe l'infection, et donc par la suite, la transmigration endothéliale. CR3 joue aussi un rôle dans la liaison et la phagocytose de particules opsonisées par le complément (C3bi), ce qui permet l'élimination de la bactérie. 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 LPS bactérien (*Talamas-Rohanna 1990*).

Il participe aussi possiblement à la signalisation du CD16b, récepteur de la portion Fc des Ac (*Zhou 1993, Edberg 1994*).

Son importance est aussi avérée par le fait que chez les bovins atteints de BLAD (ou Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency), les neutrophiles sont déficients en CD11/CD18, et la capacité d'adhésion des leucocytes est fortement diminuée. De la même manière, les capacités de phagocytose, faisant intervenir la liaison de C3bi sur CR3, sont également altérées (*Nagahata 2004*).

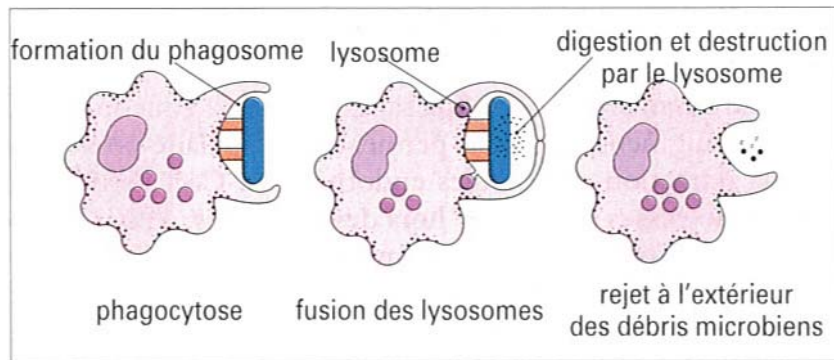
## **2.3. La phagocytose**

### **2.3.1. Les étapes de la phagocytose**

La reconnaissance et l'adhésion à la cible sont le plus souvent suivies d'une phagocytose de la particule lorsque la taille le permet et que les signaux transductionnels déclenchent le mécanisme. 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 des pseudopodes sollicite le 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 (*Kaplan 1977*). Suite à l'engagement des FcR du GNN, la polymérisation et la formation du pseudopode sont rapidement observées (*May 2001*).

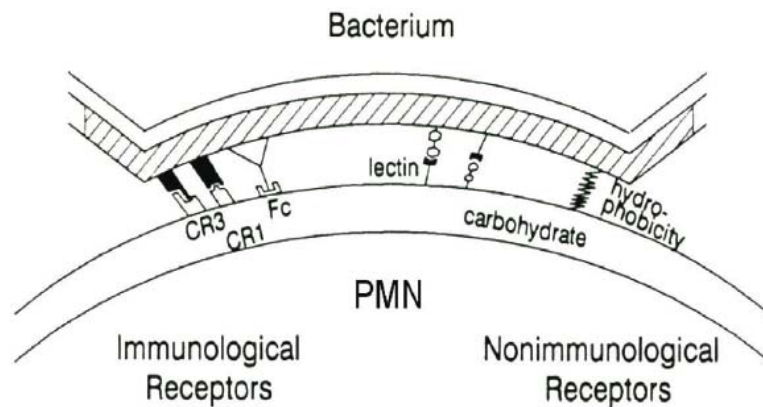
Les pseudopodes enveloppent et adhèrent progressivement à la particule, jusqu'à fusionner entre eux à la manière d'une fermeture éclair. Cela mène à l'endocytose du micro-organisme dans une vacuole de phagocytose, appelée phagosome. La particule se retrouve ainsi piégée en présence d'une très faible quantité de fluide extracellulaire.

Il s'en suit l'attaque du microbe. Les chimiokines induisent une série de changements métaboliques dont l'activation des protéines G suivie d'une libération intracellulaire de calcium, d'un remodelage des lipides transmembranaires, et de l'activation de protéines kinases (*Dale 2008*). Ces événements génèrent la fusion des granules cytoplasmiques du neutrophile avec la membrane du phagosome qui y déversent leur contenu bactéricide : c'est la naissance du phagolysosome. Le faible volume du phagosome permet de concentrer les molécules d'attaque qui vont agir directement sur la bactérie (voir figure 8).



**Figure 8** : Les étapes de la phagocytose (Roitt 2001)

Dans le cas des mammites, un important mécanisme de contrôle de l'infection réside dans la phagocytose sans opsonisation préalable (Dosogne 1998). La reconnaissance se fait par interaction entre des lectines et des récepteurs carbo-hydratés (hydrophobes) exprimés à la surface des cellules. Ainsi, une étude a montré que 18% des GNN sont capables de phagocyter *E. coli* sans l'intervention des opsonines (Paape 1996) (voir la figure 9 pour les différents mécanismes de reconnaissance précédant la phagocytose).



**Figure 9** : Les mécanismes de reconnaissance immunologiques et non immunologiques précédant la phagocytose (Ohman 1988)



### 2.3.2. Les granulations des neutrophiles

Les neutrophiles bovins possèdent trois types de granules, qui apparaissent successivement au cours de la granulopoïèse (*Bainton 1971*).

- Les granules azurophiles ou primaires :

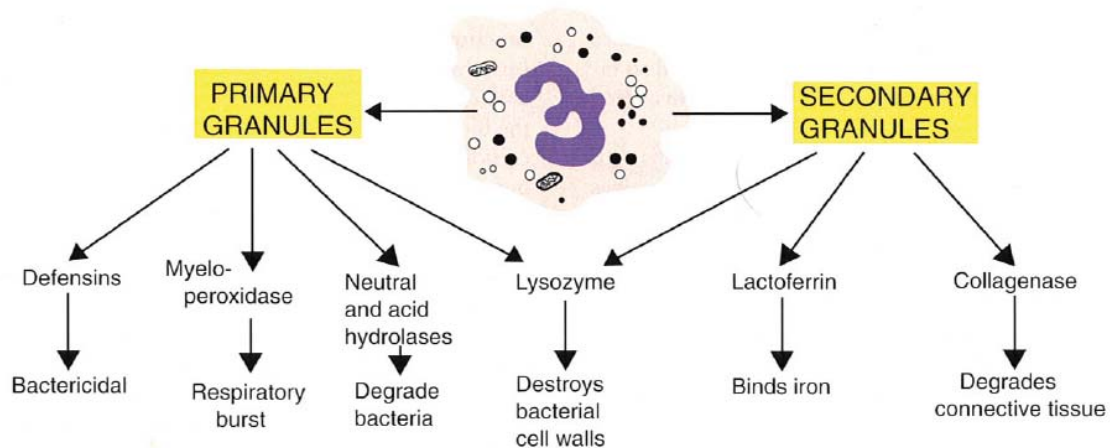
Ce sont les premiers granules à être formés. Ils sont dits « peroxydase-positifs ». Ils contiennent la myéloperoxydase (**MPO**), enzyme permettant la formation d'un produit hautement bactéricide, l'acide hypochloreux, à partir de peroxyde d'hydrogène et d'ions halogènes. Ils contiennent également du lysozyme, quoiqu'en très faible concentration dans les granules azurophiles des granulocytes bovins (*Rausch 1975*). Ils contiennent aussi des défensines ainsi que des hydrolases : la cathepsine, l'élastase et la protéase 3. Lorsque le phagosome est formé, la fusion des granules primaires et la libération de leur contenu conduit à la naissance du phagolysosome.

- Les granules secondaires ou spécifiques :

Leur formation, au stade myélocyte, stoppe la production des granules primaires. Ils sont dits « peroxydase-négatifs ». Ils contiennent des sous-unités de la NADPH oxydase et des protéines bactéricides. Les deux tiers du lysozyme total sont stockés dans ces granules. Ils contiennent également la lactoferrine, protéine chélatrice du fer, élément indispensable à la croissance des bactéries Gram-négatif (*Segal 2005*). Enfin, on y trouve de la collagénase, qui dégrade les tissus.

- Un troisième type de granules de plus grande taille a été identifié chez les bovins, les caprins et les ovins. Formés au stade myélocyte, ils sont dits « peroxydase-négatifs » et sont les plus nombreux chez les GNN matures (*Genarro 1983*). Ces granules contiennent la majorité des protéines antimicrobiennes, comme la lactoferrine et les bacténécines (Bac5, Bac7). Les bacténécines sont des polypeptides hautement cationiques qui perméabilisent les membranes interne et externe d'*E. coli*. Ils contiennent également des  $\beta$ -défensines, qui ont une activité bactéricide contre beaucoup de bactéries Gram positives et négatives, les germes anaérobies, les champignons et les virus indépendamment de l'oxygène (*Savoini 1984*).

Les contenus des granules primaires et des granules secondaires sont récapitulés dans la figure 9. Les protéases telles que l'élastase et la collagénase endommagent les tissus pour faciliter la progression des cellules. Les granules contiennent aussi des récepteurs et des protéines du complément. Toutes les sous-unités de la NADPH oxydase sont réparties dans les granules ; elles vont s'assembler dans le phagolysosome et déclencher l'explosion oxydative.



**Figure 10** : Les principaux composants des granules cytoplasmiques des neutrophiles et leurs fonctions

(d'après Tizard 2004)

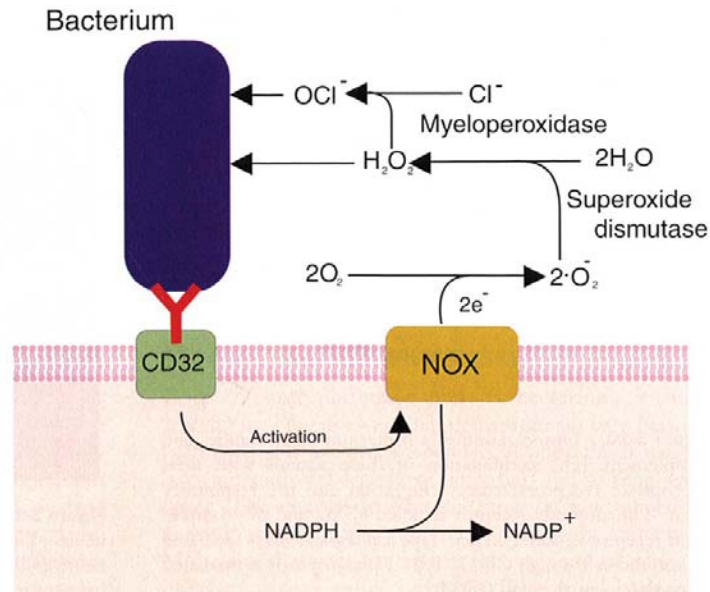
## 2.4. La destruction du microorganisme ingéré

La destruction de la particule ingérée se fait selon deux processus différents :

- formation de formes réactives de l'oxygène, appelée « explosion respiratoire »
- la libération d'enzymes lytiques et de peptides antimicrobiens

### 2.4.1. Le système de production des formes réactives de l'oxygène

L'activation du neutrophile à la suite du contact avec l'Ag est suivie d'une très forte augmentation de la consommation d'oxygène (différence d'un facteur 100). Des formes réactives de l'oxygène (**FRO**) sont générées, telles que le radical anion superoxyde ( $O_2^{\circ}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\circ}$ ) et le singulet d'oxygène ( $^1O_2$ ). Le système enzymatique initiateur de la production de ces FRO est un système multimoléculaire complexe appelé **NADPH** (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) **Oxydase** (Voir figure 11 pour les réactions de formation des FRO).



**Figure 11** : Les réactions principales de l'explosion respiratoire des neutrophiles (d'après Tizard 2004)

Le processus est initié par la liaison d'Ac sur le récepteur CD32. Les FRO les plus efficaces sont le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et l'ion hypochloreux (OCl<sup>-</sup>)

#### 2.4.1.1. *Le complexe NADPH Oxydase initie les réactions de formation des FRO*

Le complexe NADPH Oxydase (NOX) se forme à la naissance du phagolysosome, par regroupement aux niveaux membranaire et sous-membranaire de plusieurs molécules cytosoliques et membranaires. Les changements de conformation, induits principalement par des phosphorylations des composants de l'oxydase, permettent de nouvelles liaisons protéine-protéine et conduisent à l'assemblage et à l'activation de la NOX. Ce regroupement déclenche le transfert d'électrons à partir du NADPH sur la flavine, puis sur les groupements héminiques du cytochrome b, et enfin sur l'oxygène moléculaire donnant naissance à l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>o-</sup> (Babior 1999 et Naussef 2004).

##### i. **La NOX, un assemblage complexe de composants membranaires et cytosoliques**

- Les composants membranaires

Le composant essentiel de la NOX (figure 12) est le flavocytochrome b558, protéine transmembranaire associée à une protéine G de type rap1. C'est un hétérodimère constitué

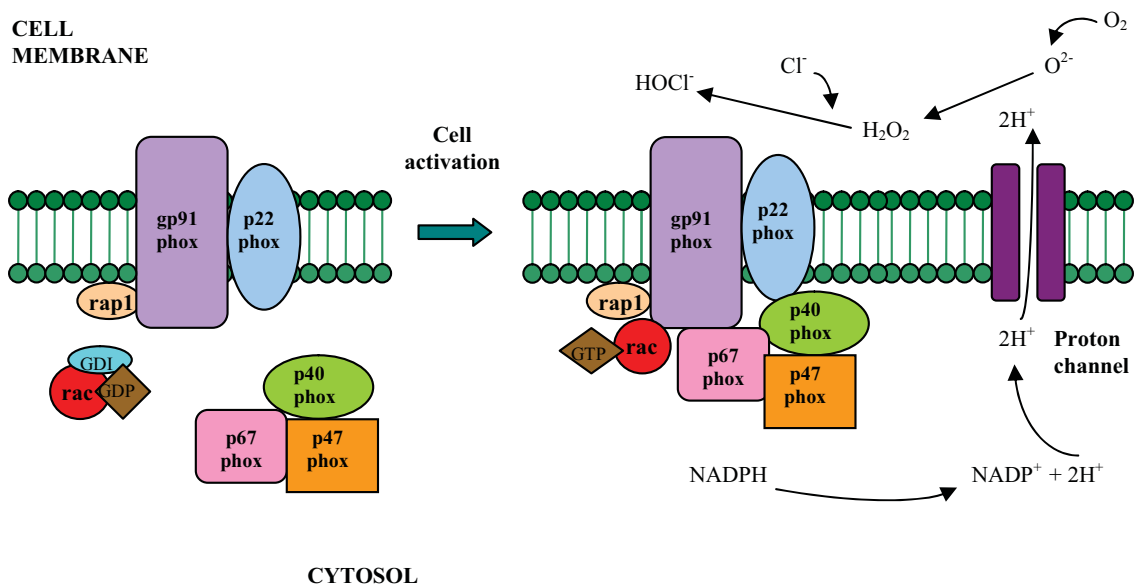
d'une sous-unité  $\alpha$  (p22phox) et d'une sous-unité  $\beta$  (gp91phox), assemblés de façon non covalente. Le flavocytochrome b558 contient 2 hèmes et une molécule de flavine adénine dinucléotide (**FAD**). Ce sont trois cofacteurs oxydo-réducteurs, à l'origine de la réduction de l'oxygène (*Cross 2004*).

La formation du flavocytochrome b558 au niveau de la paroi du phagolysosome crée un transporteur d'électrons qui sont pompés depuis le NADPH du cytosol lors de son oxydation. Les électrons sont transférés sur la flavine, puis sur les groupements hémiques du cytochrome b, et enfin sur l'oxygène moléculaire donnant naissance à l'anion superoxyde.

La liaison au NADPH et l'initiation du flux d'électrons nécessite un changement de conformation du cytochrome induit par son interaction avec des protéines cytosoliques.

- Les composants cytosoliques

Les composants cytosoliques (dans les cellules au repos) sont les protéines p47phox, p67phox et p40phox associées dans le cytosol des GNN au repos sous la forme d'un complexe de 240kDa, et une petite protéine G de type Rac2 (p21rac) dans le GNN humain. Après activation, les molécules p47phox, p67phox et p40phox sont phosphorylées et se localisent à la membrane indépendamment de la protéine G Rac2.

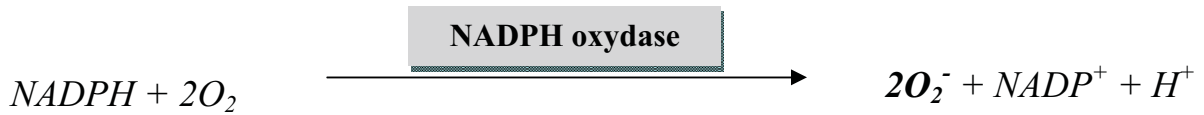


**Figure 12** : Représentation schématique de l'enzyme NADPH oxydase (*d'après Assari 2006*)

p22phox et gp91phox correspondent respectivement à la petite et la grande chaîne du cytochrome b-558. P67phox et p47phox sont 2 sous-unités ; la phosphorylation-translocation de la protéine accessoire (p40phox) et de la Rac-GTP binding protein va activer la cellule pour former le complexe NADPH oxydase, à l'origine de l'explosion respiratoire. L'ion superoxyde pourra former du peroxyde d'hydrogène et de l'acide hypochlorique.

## ii. La NOX initie l'explosion respiratoire

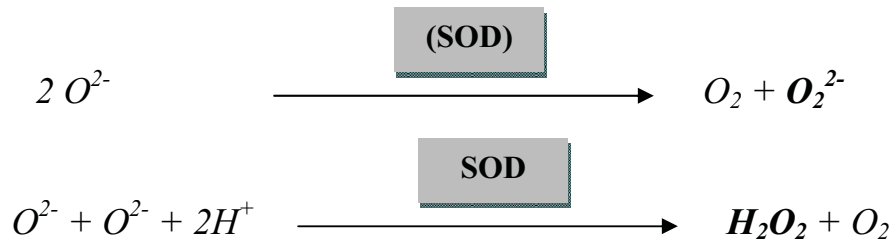
La NADPH activée convertit le NADPH (forme réduite du NADP) en NADP<sup>+</sup> en libérant un électron. L'électron est capté par une molécule d'oxygène, générant un anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>).



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

### 2.4.1.2. La formation des autres FRO

Les radicaux O<sub>2</sub><sup>•-</sup> sont transformés en O<sub>2</sub><sup>2-</sup>, puis en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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 à hème. Sa perméabilité membranaire est bonne, cependant son action est lente et de grandes quantités doivent être produites pour qu'il soit efficace.

L'interaction H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>•-</sup> peut, par la réaction de Haber-Weiss en présence d'un métal de transition, donner naissance au radical hydroxyle OH<sup>•</sup> hautement toxique et 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). Cette réaction reste limitée grâce à la dismutation spontanée rapide de

l'anion superoxyde qui ne s'accumule donc pas, contrairement au peroxyde d'hydrogène qui est plus stable.

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 (HOCl), composé très voisin de l'eau de javel hautement bactéricide :



L'acide hypochloreux est l'un des oxydants les plus puissants 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 (Voir encadré 2 pour quelques éléments supplémentaires au sujet de la MPO).

Le peroxyde d'hydrogène peut réagir avec d'autres halogènes ( $Br^-$ ,  $I^-$  et  $SCN^-$ ).

**Encadré 2** : La myéloperoxydase, enzyme clef des défenses anti-bactériennes

La myéloperoxydase a été décrite pour la première fois par Agner en 1941 sous le nom de verdoperoxydase.

La MPO est une protéine di-héminique composée de deux hétérodimères identiques, reliées par des ponts disulfures. Chaque hémi-enzyme est constituée de 2 sous-unités (une chaîne légère de 15 kDa et une chaîne lourde de 59 à 64 kDa) (Nauseef 2000). Les chaînes lourdes sont reliées à un noyau héminique nécessaire à l'activité de la MPO. Les particularités du spectre d'absorption de l'hème sont responsables de la coloration verte du pus (Fiedler 2000). Cette enzyme représente 5% des protéines totales du neutrophile (soit 25% des protéines présentes dans les granules), et est présente dans les granules cytoplasmiques à très grande concentration (jusqu'à 100 mg / mL dans le phagolysosome) (Segal 2005).

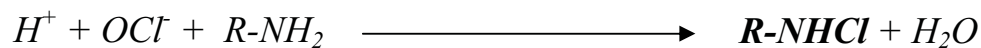
L'halogénéation induite par la MPO représente un mécanisme antimicrobien très important. En médecine humaine, une immunodéficiencia a été observée chez certains patients dont les neutrophiles possèdent trop peu de MPO (Lehrer 1969).

En plus de la formation d'acide hypochloreux, la MPO présente d'autres propriétés. Certains de ses produits contribuent à l'arrêt de la réponse inflammatoire en induisant l'apoptose des GNN et d'autres cellules immunitaires. A l'inverse, sa libération depuis les cellules nécrotiques stimule l'inflammation (recrutement de GNN, modification des constituants tissulaires...) (Arnhold 2010).

La myéloperoxydase est une enzyme multifonctionnelle dont certains rôles restent probablement à découvrir.

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 de l'oxygène est produit en grande quantité par les GNN. Il possède une forte activité bactéricide (*Stief 2003*) associée à une moindre toxicité tissulaire 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, oxydant moyen à longue durée de vie, qui est elle aussi bactéricide (*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 du processus de phagocytose. Ainsi l'enzyme produit  $O_2^-$  à l'intérieur de la vésicule, qui est rapidement transformé sous la forme d'autres FRO plus stables et plus réactives. L'agent pathogène phagocyté baigne alors dans un mélange létal d'agents oxydants.

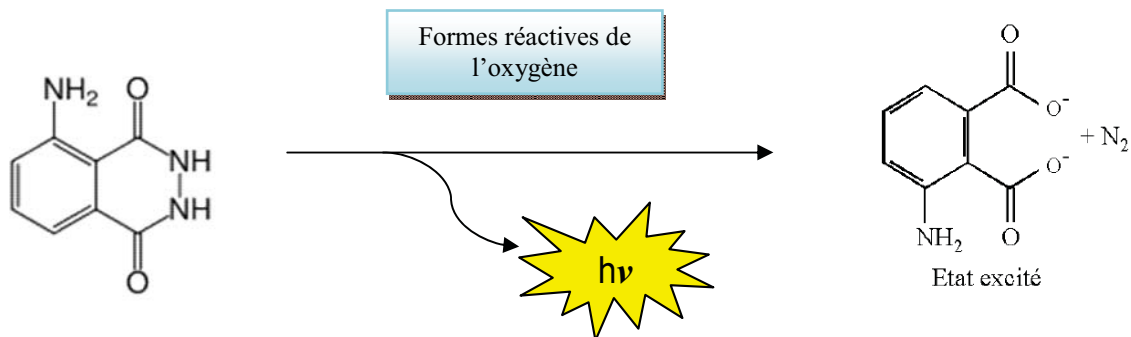
Cependant, produites de façon excessive ou inappropriée dans le milieu extracellulaire, les FRO peuvent provoquer des lésions tissulaires au sein du site de production. En effet, les conséquences biochimiques associées à l'action des FRO sont multiples : elles peuvent provoquer des peroxydations lipidiques aboutissant à une désorganisation membranaire, une atteinte protéique avec fragmentation, agrégation, oxydation des groupements sulfhydriles, une atteinte des acides nucléiques avec cassure et mutation de l'ADN.

Les neutrophiles sont équipés de mécanismes de défense qui détoxifient les oxydants. Par exemple, le glutathion réduit les oxydants, et des antioxydants tels que l'ascorbate et la vitamine E interrompent les réactions d'oxydoréduction.

#### **2.4.1.3. Mesure de l'activité bactéricide par chimioluminescence**

L'explosion respiratoire peut être mesurée par chimioluminescence au luminol. Le luminol est une molécule, qui, lorsqu'elle est excitée libère des photons. Or il a été découvert que les formes réactives de l'oxygène produites par les cellules excitent le luminol et

conduisent à l'émission de lumière (figure 13). La particularité du luminol est sa capacité à traverser les membranes cellulaires ; cela permet de repérer les FRO produites dans les phagolysosomes, ainsi que celles libérées à l'extérieur de la cellule (Dahlgren 2007).



**Figure 13** : Schéma du mécanisme de chimioluminescence au luminol

## 2.4.2. Les enzymes lytiques et les protéines antimicrobiennes

### 2.4.2.1. Les enzymes lytiques

La naissance du phagolysosome est suivie d'une augmentation du pH transitoire, avant une acidification 10 à 15 minutes plus tard. Il est probable que l'acidification elle-même est capable de tuer certains germes, mais c'est son rôle activateur des enzymes lysosomiales, dont l'activité est optimale à pH acide, qui prime (Roitt 2001).

La fusion des granules primaires libère des enzymes telles que des protéases, des hydrolases acides, et la MPO, qui vont attaquer la membrane du microorganisme. Les bactéries Gram<sup>+</sup> y sont plus sensibles que les Gram<sup>-</sup>. Libérées dans les tissus, ces enzymes vont induire la libération de TNF- $\alpha$  de la part des macrophages et recruter d'autres GNN.

### 2.4.2.2. Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens ont des particularités physico-chimiques (charges positives, régions hydrophiles et hydrophobes) qui leur confèrent la capacité de former des pores dans la paroi du microorganisme, provoquant ainsi sa mort. Leur affinité pour certaines molécules microbiennes (LPS, acides téichoïques) préserve les cellules hôtes. Leur spectre d'action est large : bactéries, levures, protozoaires, virus enveloppés, cellules tumorales.



Les défensines, au nombre de 13 chez les bovins, représentent 15% des protéines contenues dans les granules du GNN. Elles peuvent tuer ou simplement inactiver le microbe phagocyté (Tizard 2004).

#### **2.4.2.3. *Le lysozyme***

Présent dans les neutrophiles de nombreuses espèces, on n'en retrouve chez les bovins qu'en de très petites quantités dans les GNN et dans certains fluides corporels. Il détruit les peptidoglycanes bactériens.

#### **2.4.2.4. *Les lectines***

Ce sont des molécules qui se fixent aux sucres. La plus importante est la **MBL** (Mannose-Binding Protein), retrouvée majoritairement dans le sérum. Les lectines agissent comme des opsonines puisqu'elles se fixent à la membrane des microorganismes et sont reconnues par les phagocytes.

#### **2.4.2.5. *Les protéines chélatrices du Fer***

Le Fer est un facteur de croissance de nombreuses espèces bactériennes. Dans l'organisme, le Fer est fixé à des protéines chélatrices : la transferrine, la lactoferrine, l'haptoglobine, et la ferritine.

On retrouve la lactoferrine (**Lf**) dans les granules neutrophiliques. Libérée dans le phagolysosome, elle va capter le Fer et inhiber la croissance bactérienne.

#### **Encadré 3 : La lactoferrine, une molécule multifonctionnelle**

Longtemps considérée comme simple chélateur du fer et protégeant ainsi contre les infections bactériennes, des découvertes récentes décrivent d'autres fonctions de la lactoferrine : immunomodulation, protection contre le cancer et régulation de la croissance osseuse (Pierce 2009).

En plus des granules des GNN, on la retrouve dans les liquides corporels : lait, larmes, bile, salive et sécrétions des organes reproducteurs et des tractus respiratoire et gastro-intestinal.

La Lf est un élément clef du système de défense inné de l'hôte et possède un large spectre antimicrobien (bactéries G<sup>+</sup> et G<sup>-</sup>, levures, champignons, certains virus et protozoaires et prions). Son expression peut être directement induite par un stimulus pro-inflammatoire : LPS ou ARN double brin, mimant une attaque virale (*Li 2009*).

Elle est bactériostatique et bactéricide. En plus de priver les bactéries du fer, elle est capable de se fixer directement à la paroi des bactéries, ce qui a pour effet de fragiliser et perméabiliser la membrane, et inhiber l'attachement aux cellules hôtes. Il semblerait qu'elle soit également capable d'inhiber la formation de biofilms bactériens. Elle exerce une activité antivirale (notamment vis-à-vis du virus de l'hépatite, de l'herpès et du VIH), par des mécanismes non élucidés. Son activité antifongique est illustrée par la guérison de la candidose buccale grâce à la Lf (*Jenssen 2009*).

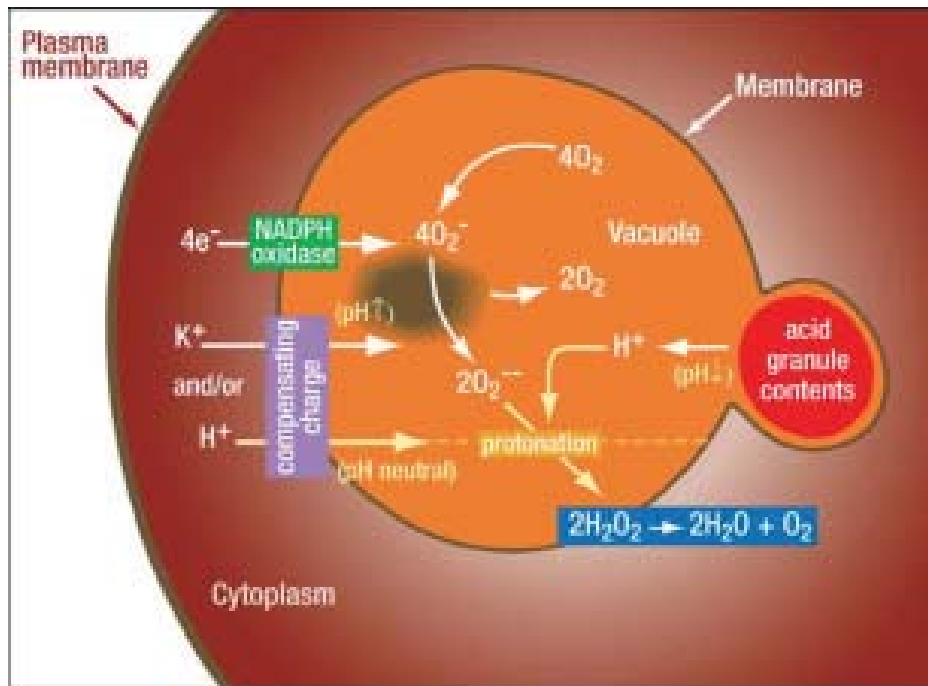
La Lf est aussi un puissant modulateur de la réponse inflammatoire (*Ward 2005*) : modulation de la production de cytokines, recrutement de cellules immunes au site de l'inflammation, protection contre certaines maladies inflammatoires par diminution de la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 et augmentation de l'IL-10.

En exerçant un rôle de surveillance de la croissance des cellules, la Lf lutte contre la tumorigenèse et le développement de métastases (*Tsuda 2002*).

En pathologie bovine, la lactoferrine constitue un élément incontournable de la glande mammaire, notamment en période de tarissement, compte tenu de son absence de toxicité, sa haute concentration, son indépendance vis-à-vis de l'oxygène, et compte tenu de la faible activité des cellules immunitaires dans le lait. Les nombreuses activités biologiques de la Lf associée à son absence de toxicité font qu'elle suscite aujourd'hui un grand intérêt industriel en thérapeutique (traitement adjuvant à l'antibiothérapie) et en agro-alimentaire qui la classe aujourd'hui parmi les alcaliments.

### **2.4.3. Les conditions d'activation des enzymes dans la vacuole phagocytaire**

Les dégradations tissulaires observées suite à la nécrose des neutrophiles et la libération accidentelle de leurs enzymes dans les tissus, bien que remarquables, ne sont pas à la mesure de la capacité destructrice associée à la vacuole phagocytaire. En effet, dans les tissus, elles ne sont pas dans les conditions d'activation du lysosome (pH, hypertonicité). Les réactions d'oxydo-réduction initiées par la NOX génèrent des déséquilibres de charges qui doivent nécessairement être compensés. Des échanges ioniques entre le cytoplasme et l'intérieur du phagolysosome, qui impliquent notamment le K<sup>+</sup>, rétablissent ce déséquilibre (*Reeves 2002*) (voir figure 14).



**Figure 14** : Représentation schématique des échanges membranaires du phagolysosome lors de l'explosion respiratoire (d'après Segal 2005)

Le fonctionnement de la NOX dépolarise la membrane. La compensation des charges électroniques est responsable de changements de tonicité et de pH vacuolaires. Les électrons sont transportés à travers la membrane du phagolysosome pour former de l' $O_2^-$ , qui se dismute en  $O_2^{2-}$ . Des protons s'associent à l' $O_2^-$  et  $O_2^{2-}$  pour former  $H_2O$  et  $H_2O_2$ . La consommation de protons fait augmenter le pH malgré la libération du contenu acide des granules. Ceci ne peut se faire que si la différence de charge est compensée par d'autres ions, notamment par le passage de  $K^+$  cytoplasmique.

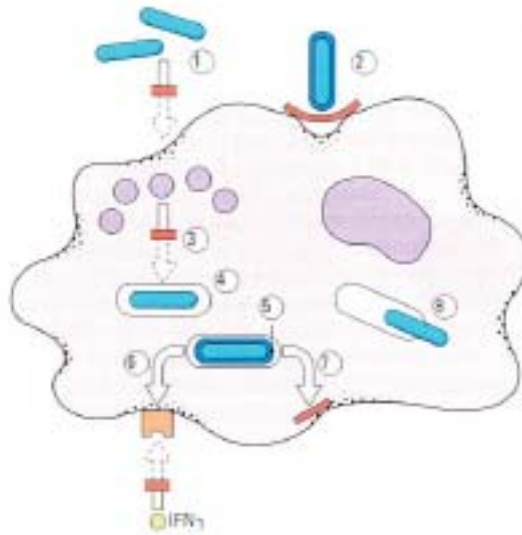
#### 2.4.4. Le neutrophile et ses limites

Les neutrophiles ont un rôle central dans la réponse immunitaire non spécifique, grâce à leur rapidité d'action, leurs capacités à communiquer avec d'autres cellules effectrices, leur action bactéricide via la phagocytose.

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 des neutrophiles peuvent être facilement dépassées, et l'infection s'installe. D'autre part, ce sont parfois les fonctions du neutrophile qui sont affectées (voir encadré 4).

#### **Encadré 4** : Adaptation des bactéries pour échapper aux phagocytes

La plupart des germes phagocytés finissent par être tués. Certaines bactéries réussissent à survivre car elles ont développé des mécanismes de résistance à la phagocytose (Roitt 2001).



**Figure 15** : Représentation schématique de certains mécanismes développés par les bactéries pour échapper aux phagocytes (d'après Roitt 2001)

Certaines bactéries ont évolué de façon à échapper à la lyse par les cellules phagocytaires, notamment celles qui réussissent à parasiter les phagocytes. Certaines sécrètent des substances répulsives ou des toxines qui inhibent le chimiotactisme (figure 15-1). D'autres sont équipées d'une capsule ou d'une couverture moléculaire qui inhibe la fixation aux phagocytes (figure 15-2). Dès leur ingestion, certaines sécrètent des molécules qui inhibent la fusion des lysosomes avec le phagosome (exemple : *Mycobacterium tuberculosis*). Elles peuvent aussi inhiber la pompe à protons qui acidifie la vacuole (figure 15-3). D'autres encore sécrètent une catalase qui neutralise le peroxyde d'hydrogène (figure 15-4). Certaines se protègent contre les FRO, comme *Mycobacterium leprae* qui s'entoure d'un glycolipide phénolique qui neutralise les radicaux libres (figure 15-5). Les mycobactéries libèrent également des molécules qui bloquent la capacité des macrophages à répondre aux effets activateurs de l'IFN $\gamma$  (figure 15-6). Les phagocytes infectés peuvent aussi perdre leur capacité à présenter l'Ag (figure 15-7). Certains micro-organismes peuvent quitter les phagosomes pour se multiplier dans le cytoplasme ; c'est le cas de *M. paratuberculosis* qui provoque ainsi la mort de la cellule (figure 15-8).

#### **2.4.5. Les variations des capacités neutrophiliques**

Le système immunitaire immature du veau nouveau-né le rend plus sensible aux infections que le bovin adulte. En médecine humaine, une étude des capacités de phagocytose des neutrophiles a montré que les GNN extraits du cordon ombilical de nouveau-nés prématurés ou à terme sont déficients par rapport aux GNN d'individus adultes. Cette déficience est transitoire puisqu'elle disparaît après l'âge de 3 jours (*Filias 2011*).

Malgré une fonctionnalité optimale des neutrophiles après quelques jours, certaines bactéries parviennent malgré tout à déjouer la phagocytose grâce à diverses adaptations (encadré 4).

Au cours de la gestation, le nombre de neutrophiles immatures augmente progressivement. Leur activité phagocytaire augmente en parallèle, afin de compenser peut être en partie la faiblesse de l'immunité spécifique durant cette période (*Pramanik 2007*).

D'autre part, l'activité des neutrophiles dépend également du stade de lactation : en début de lactation, le taux d'apoptose des GNN est plus élevé qu'en milieu de lactation (*Van Oostveldt 2001*), de même que la phagocytose et la bactéricidie sont altérées (*Van Oostveldt 2002*).

Certaines affections, telles que la stéatose hépatique dans les deux semaines suivant la mise bas, semblent avoir un effet notable sur les fonctions des GNN prélevés à partir du sang et de l'utérus. Cependant la variabilité interindividuelle est très forte et les résultats sont difficiles à généraliser (*Zerbe 2000*).

### **2.5. Le neutrophile du 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<sup>-1</sup> de lait, dont 5 à 20% sont des GNN (*Rainard 2003*). Ils ont un rôle de surveillance et sont considérés comme la première barrière de défense immunitaire. Ils assurent la destruction précoce d'un faible nombre de bactéries infectantes qui parviennent à passer le sphincter du trayon. Cependant, si les agents infectieux sont trop nombreux ils se développent dans la glande mammaire et la barrière neutrophilique est insuffisante. 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 bactéricides que les GNN du sang (*Mehrzaad 2001*). En effet, pour plusieurs raisons, 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 et de la caséine, ce qui a pour effet de modifier la morphologie et les granulations de la cellule (diminution de la surface membranaire et du nombre de récepteurs), 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'action des neutrophiles dans le lait réside surtout dans leur capacité à produire des cytokines et de libérer des peptides antimicrobiens (lactoferrine) (*Stelwagen 2009*).

En plus des effets néfastes directs des bactéries et de leurs produits sur l'épithélium sécrétoire, ce sont aussi les GNN, via les FRO et les enzymes protéolytiques qu'ils libèrent, qui endommagent la glande et font baisser la production laitière (*Sordillo 1989, Zhao 2008*).

## **2.6. Le neutrophile, un effecteur incontournable de la défense de l'organisme**

Les neutrophiles sont les premiers médiateurs de la défense immunitaire spontanée contre de nombreux micro-organismes qui agit avant la mise en place de l'immunité spontanée. Une baisse des fonctions neutrophiliques ou une neutropénie génère une immunodéficience, que la cause soit iatrogène, génétique ou métabolique.

### **2.6.1. Immunodéficience iatrogénique**

L'importance des neutrophiles est soulignée par le fait que les neutropénies iatrogènes, induites à la suite d'une chimiothérapie ou de traitements à base de molécules cytotoxiques, sont la cause la plus sévère de déficience immunitaire (*Malech 2007*).

L'effet immunosuppresseur des corticoïdes est bien connu. La neutrophilie observée suite à l'administration de glucocorticoïdes est le résultat d'une baisse d'adhésion des GNN et donc d'une démarginalisation des cellules qui étaient adhérentes à la paroi des vaisseaux. Les glucocorticoïdes provoquent une diminution de l'expression du gène codant la L-sélectine, ce qui affecte les capacités de diapédèse des neutrophiles (*Weber 2001*). D'autre part, les corticoïdes peuvent légèrement diminuer la bactéricidie, sans altérer cependant la phagocytose.

Certaines molécules utilisées en thérapeutique sont responsables d'une neutropénie. C'est le cas de la clozapine (stimulateur de l'apoptose), du propylthiouracil (destructeur des neutrophiles via le complément), des  $\beta$ -lactamines (inhibiteurs de la granulopoïèse) (*Mintzer 2009*). Malgré des traitements de plus en plus efficaces, on observe chez les patients atteints de neutropénie iatrogène 5% de mortalité.

## **2.6.2. Immunodéficience héréditaire**

Des formes héréditaires de neutropénie sont aussi associées à une augmentation du risque de développer des infections bactériennes et fongiques. Les patients présentant des déficiences des fonctions neutrophiliques sont sujets à des infections bactériennes récurrentes et/ou difficiles à traiter.

### **2.6.2.1. Immunodéficience et adhésion des neutrophiles : exemple de la LAD**

Chez les bovins, une maladie héréditaire connue sous le nom de Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (**BLAD**) est une maladie congénitale autosomale récessive qui affecte le CD18 $\beta$ , intégrine indispensable à la migration du GNN vers les sites d'infection (*cf. § 2.1.4.2. iii.*). Cliniquement, les animaux présentent des ulcères buccaux, une sévère parodontite provoquant une chute des dents, une pneumonie chronique et une diarrhée récurrente. La BLAD provoque une neutrophilie permanente associée à des infections récurrentes multiples évoluant le plus souvent vers la mort avant l'âge de 6 mois, le plus souvent à la suite d'une complication infectieuse : septicémie, péritonite, méningite ou pneumonie (*Gourreau 1998, Nagahata 2004*). En médecine humaine, les patients atteints d'une LAD sévère doivent subir une greffe de moelle osseuse.

### **2.6.2.2. Immunodéficience et dysfonctionnement du métabolisme oxydatif : exemple de la CGD**

Chez l'homme, la maladie granulomateuse chronique (**CGD** = Chronic Granulomatous Disease) est la maladie affectant les phagocytes la plus répandue. C'est une affection génétique qui concerne le complexe NADPH oxydase (*Kobayashi 2004*). Les patients atteints de CGD présentent des réactions inflammatoires excessives, une faible capacité de cicatrisation, ainsi qu'une tendance à développer des désordres autoimmuns comme la maladie de Crohn.

Une autre maladie héréditaire relativement fréquente (atteignant 1/4000 patients) est la déficience en MPO. Toutefois elle présente rarement des répercussions cliniques.

### **2.6.3. Immunodéficience et métabolisme azoté**

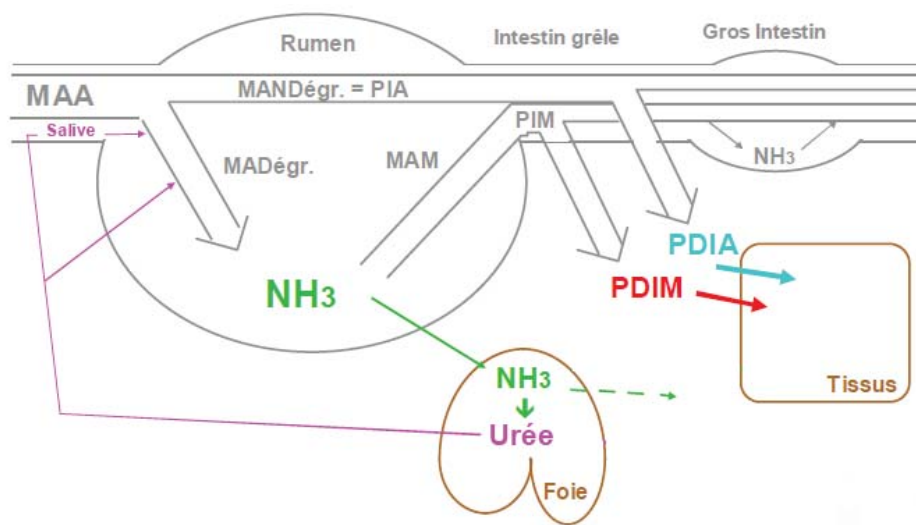
#### **2.6.3.1. Les bases du métabolisme azoté chez les ruminants**

Chez les monogastriques, les protéines sont digérées au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle grâce à l'action enzymatique des sucs digestifs. Chez les ruminants, une grande partie de la protéolyse s'effectue dans les pré-estomacs grâce aux micro-organismes. Alors que la MAT contenue dans les protéines (azote protéique) est hydrolysée par la flore ruminale, l'azote non protéique (**ANP**) est transformé directement en ammoniac. Les protéines sont dégradées par les bactéries et les protozoaires en polypeptides, en oligopeptides, puis en acides aminés qui seront désaminés, pour finalement former des acides gras volatils (**AGV**) et de l'ammoniac (**NH<sub>3</sub>**). Environ 90% des AGV et 10% du NH<sub>3</sub> sont absorbés par la muqueuse ruminale. Les AGV et le NH<sub>3</sub> restants sont utilisés par la flore ruminale pour sa propre synthèse protéique, sous la dépendance des apports énergétiques. Les protéines contenues dans les corps bactériens et les protozoaires constituent la matière azotée d'origine microbienne (**MAM**), dont 80% va transiter vers l'intestin pour constituer les protéines intestinales d'origine microbienne (**PIM**).

Cependant, une partie des protéines (les protéines insolubles et quelques protéines solubles) ne subit pas de dégradation et passe directement vers l'intestin grêle, constituant la matière azotée non dégradée appelée aussi Protéines Intestinales d'origine Alimentaire (**PIA**).



Dans l'intestin, environ 80% des PIM et des PIA seront digérées : ce sont les **PDIM** et les **PDIA**, pour Protéines réellement Digérées dans l'Intestin, respectivement d'origine Microbienne ou Alimentaire (figure 16).



**Figure 16** : Schéma de l'utilisation métabolique de la Matière Azotée chez les ruminants  
(d'après Enjalbert 2007)

Le  $\text{NH}_3$  absorbé au niveau du rumen rejoint le foie par la veine porte, où il est fortement capté, puis métabolisé en urée. En fonction de la quantité de MAT ingérée, l'azote sera plus ou moins recyclé grâce à la ré-excrétion de l'urée dans la salive.

Le système PDI permet d'évaluer la part respective de l'aliment et des micro-organismes dans l'absorption intestinale d'azote. Il permet d'attribuer à un aliment deux valeurs azotées distinctes :

- **PDIN** = PDIA + PDIMN, où PDIMN est la quantité de PDIM synthétisées grâce à la quantité d'ammoniac et d'acides aminés libérés par l'aliment lorsque la quantité d'énergie nécessaire à la synthèse protéique microbienne n'est pas limitante
- **PDIE** = PDIA + PDIME, où PDIME est la quantité de PDIM synthétisées grâce à l'énergie d'origine alimentaire lorsque la quantité d'ammoniac et d'acides aminés nécessaires à la synthèse protéique microbienne n'est pas limitante.

Equilibrer la ration revient à rechercher l'égalité  $\text{PDIN} = \text{PDIE}$ . La plus petite valeur des deux est la valeur réelle de l'aliment :  $\text{PDI} = \min(\text{PDIN} ; \text{PDIE})$ .

Dans l'alimentation des bovins laitiers, dans le but d'équilibrer la ration en matières azotées, on peut être amené à utiliser une forme d'azote non protéique constituant une source de PDIN dépourvue de PDIE. La plus fréquemment utilisée est l'urée, qui est la plus riche en

azote (46%). Soluble, elle est rapidement et entièrement dégradée dans le rumen. Le pic de production de NH<sub>3</sub> associé à l'urée sera plus précoce que le pic de production de NH<sub>3</sub> associé aux autres constituants de la ration.

Le métabolisme de l'ammoniac en urée est rapide et efficace : l'ammoniémie d'un bovin est normalement très faible (proche de 0 mmol.l<sup>-1</sup>). Si les capacités de métabolisation hépatique sont dépassées, il apparaît alors une hyperammoniémie et une hyperurémie associée. Or si l'ammoniac est toxique pour l'organisme, l'urée l'est également, à concentration élevée.

La cause majeure d'augmentation des taux sanguins d'urée et d'ammoniac chez les bovins est un excès de PDIN. Celui-ci peut être dû à une erreur de rationnement, ou plus rarement à l'ingestion accidentelle d'une grande quantité d'azote. 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, au moment de la mise à l'herbe et le passage d'une ration hivernale à la consommation d'herbe jeune riche en MAT, il existe souvent une augmentation brutale de la quantité d'azote ingérée.

### **2.6.3.2. Immunodéficiences et hyper-urémie**

En médecine humaine, les infections sont une cause majeure de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de maladies rénales à un stade avancé. Compte tenu du rôle central des neutrophiles dans la défense contre les infections bactériennes, de nombreuses études reposent sur le rôle de l'urémie dans l'immunodéficiences de ces personnes.

Les patients insuffisants rénaux souffrent de désordres métaboliques responsables d'une baisse des fonctions neutrophiliques (*Cohen 1997, Vanholder 1993*) : augmentation du Fer libre, augmentation du Calcium intracellulaire, carence en Zinc, malnutrition, anémie.

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*).

Certaines molécules retrouvées dans le sérum de patients urémiques affectent certaines fonctions neutrophiliques : les toxines urémiques telles que la spermine et la spermidine altèrent la migration des GNN (*Ferrante 1985*) et le p-crésol inhibe l'explosion respiratoire des granulocytes (*Vanholder 1995*) ; la leptine, hormone de la satiété, qui est retrouvée en

grande quantité chez ces patients, désensibilise les GNN vis-à-vis de la chimiotaxie (*Ottonello 2004*). 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 2006*), ce qui est en accord avec les résultats de *Perinayagam et al. (2000)* qui ont montré que les taux de sFas (Fas soluble) 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 fortement 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 la liaison Fas/Fas-L 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.

En médecine bovine, une étude réalisée *in vitro* par *Murata et Horino (1998)* met aussi en évidence le rôle néfaste d'une exposition à des doses élevées d'ammoniac atmosphérique : 50, 100 et 200 ppm pendant 1 heure. Il a été mis en évidence que l'ammoniac augmente la chimioluminescence (augmentation de 14 à 21 % à 50 et 100 ppm) et diminue la taille des populations de neutrophiles (baisse de 40 % à 200 ppm). D'autre part, il a été montré que l'ammoniac inhibe les fonctions des neutrophiles : chémotactisme, phagocytose, dégranulation et bactéricidie par alcalinisation du pH intralysosomal (*Coppi 1989*). A contrario, les macrophages se sont avérés insensibles aux fortes expositions à l'ammoniac.

Les troubles infectieux observés lors de transitions alimentaires (pathologies mammaires, utérines...) méritent donc d'être étudiés sur la base des fonctions neutrophiliques. En effet, à certaines périodes du cycle de production, le taux d'azote soluble de la ration peut augmenter brusquement ; parmi les conséquences, il existe une élévation de l'urémie, qui pourrait avoir un effet délétère sur les capacités de défense de l'organisme.

## **Partie II : ETUDE EXPERIMENTALE**

L'objectif de cette étude expérimentale est d'évaluer l'effet d'une augmentation brutale de la teneur de la ration en MAT sur les fonctions neutrophiliques des bovins. Pour cela, nous avons comparé la numération et certaines fonctions des neutrophiles entre des bovins exposés à une augmentation brutale de la teneur en azote soluble de la ration et des bovins nourris avec une ration dont la teneur en MAT est proche de celle communément rencontrée dans les élevages. Ce travail fait suite à une première étude où les effets chroniques avaient été recherchés. Dans ce présent essai, nous analysons les effets apparaissant dans les heures qui suivent la modification du rationnement (modèle aigu).

### **1. Matériels et Méthodes**

#### **1.1. Les animaux**

Les animaux utilisés dans cette étude sont des bovins mâles castrés de race Prim'Holstein âgés de 28 mois et élevés sur le site de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) depuis l'âge de un jour. Chacun d'eux est équipé d'une canule ruminale bien tolérée, mise en place pour des prélèvements ruminiaux dans un essai précédent. Au cours de notre étude, les bœufs seront désignés par les lettres A, B, C, D.

Les poids respectifs des animaux au début de l'étude sont de 738, 693, 724, et 713 kg, pour les animaux A, B, C et D respectivement.

#### **1.2. Date et lieu de l'étude**

L'expérimentation se déroule en 2 sessions, entre les mois de mars et juin 2009 (voir calendrier expérimental en annexe 2), sur le site de l'ENVT.

Les animaux sont logés dans deux salles distinctes des hôpitaux de pathologie des ruminants de l'ENVT (2 animaux par salle : A et D dans une salle, B et C dans l'autre) ; les animaux sont à l'attache sur tapis et paille, avec un abreuvoir commun.

Afin de contrôler parfaitement la ration ingérée, l'auge devant chaque stalle est séparée physiquement, et le paillage n'est effectué qu'à l'arrière des animaux pour éviter l'ingestion parasite de paille.

Dans une troisième salle à proximité des animaux sont stockées les matières premières de la ration. En outre, les équipements nécessaires aux premières analyses sont installés sur une table dans le même local.

### **1.3. Alimentation et protocole expérimental**

#### **1.3.1. Rationnement pré-essai**

Durant 2 semaines avant le début de l'essai, les bœufs reçoivent quotidiennement une ration à base de foin, de luzerne déshydratée, de tourteau de soja 48, de maïs et d'aliment minéral vitaminé (**A.M.V**) (voir tableau 3 pour les quantités distribuées). La ration est équilibrée à 12 % de matière azotée totale (**M.A.T**) et distribuée deux fois par jour en quantité égale et à heures fixes (8h et 18h).

#### **1.3.2. Rationnement expérimental**

Deux rations isoénergétiques à base de luzerne déshydratée, de foin de prairie permanente, de tourteau de soja 48, d'urée, de maïs et d'A.M.V (mêmes aliments qu'en phase expérimentale) ont été calculées à l'aide du Logiciel Larelev® (ENVT) (voir annexe 1 pour l'analyse de la ration et la valeur alimentaire des fourrages ; voir tableau 3 pour les quantités distribuées). Les proportions d'apport azoté ont été ajustées de manière à obtenir deux rations avec des MAT différentes :

- une ration à 14 % de MAT (appelée ration 1) : l'azote est apporté exclusivement par le tourteau de soja
- une ration à 20 % de MAT (appelée ration 2) : l'azote est apporté sous la forme de tourteau de soja et d'urée (3 %).

La différence entre les 2 rations porte donc sur la teneur en MAT mais aussi sur la nature des sources d'azote : compte tenu de la vitesse de dégradation, la production d'ammoniac dans le rumen est nettement plus rapide avec un apport sous la forme d'urée que de tourteau de soja.

	<b>Ration pré-essai</b>	<b>Ration 14 % MAT</b>	<b>Ration 20 % MAT</b>
Luzerne	7,5	10	10
Foin	7,5	5	5
Tourteau de Soja 48	0,5	1	2,3
Urée	0	0	0,17
Maïs	1	1,3	0
AMV 15/11/6	0,06	0,06	0,06

**Tableau 3** : Composition des rations (aliment en kg de MB par jour)

### 1.3.3. Schéma expérimental

Chacune des phases expérimentales (ou sessions) est précédée d'une phase d'adaptation de 2 semaines : le logement, les aliments (excepté l'urée), et le rythme de distribution de la ration sont les mêmes pendant la phase d'adaptation et pendant l'essai.

Les quatre bœufs sont répartis aléatoirement en 2 groupes en fonction de la ration : A-C et B-D. L'expérimentation est basée sur une rotation en « cross over » : pour une session, chaque couple reçoit une des 2 rations (cf. tableau 4). Chaque session dure 10 jours. Les 2 sessions sont séparées d'une période de chasse « wash-out » de 1 mois (phase d'adaptation incluse).

	<b>Ration 14 % MAT</b>	<b>Ration 20 % MAT</b>
Session 1	A-C	B-D
Session 2	B-D	A-C

**Tableau 4** : Ration distribuée à chaque session pour chaque animal durant l'étude

La répartition des animaux dans les salles est effectuée de manière symétrique dans chaque salle, si bien que chaque bœuf ne reçoit pas la même ration (tableau 5).

	<b>Salle 1</b>	<b>Salle 2</b>
Session 1	B / C	A / D
Session 2	A / D	B / C

**Tableau 5** : Répartition des bœufs dans les salles pour chaque session

## 1.4. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins ont lieu sur chaque bœuf les jours 1, 2, 3, 4, 8 et 10 de chaque session (voir Annexe 2). Des tubes système Vacutainer sont utilisés. A chaque date de collecte, les prélèvements (3 tubes héparinés, 1 tube sec), sont réalisés à 8h, 9h, puis toutes les 2h entre 10h et 18h (soit 7 points de collecte, nommés H8, H9, H10, H12, H14, H16 et H18). En outre, au point H9 un tube EDTA et 7 tubes **ACD** (Acide-Citrate-Dextrose) sont prélevés. Enfin, un dernier prélèvement sanguin (tube hépariné) est effectué au cours de la deuxième semaine de chaque session.

Le sang est prélevé à la veine jugulaire, après désinfection de la zone de ponction avec une solution iodée (Vetedine® Solution), les zones de ponction ayant été rasées avant l'expérimentation.

Afin de limiter les risques de phlébite, les bœufs sont immobilisés à l'aide d'un licol avant chaque prise de sang, la latéralisation des prélèvements est régulièrement inversée et des aiguilles fines sont utilisées (taille 40 X 0.9 mm).

Les points de prélèvements sont réalisés dans le même ordre pour chaque session : A, D, C puis B pour la session 1 ; B, C, D puis A pour la session 2.

### 1.4.1. Biochimie

#### 1.4.1.1. *Les gaz sanguins*

Le prélèvement est effectué dans un tube hépariné placé dans de la glace pilée entre le moment de la collecte et celui de l'analyse. 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) muni de cassettes (VetStat fluído-therapie/Acide-Base ; IDEXX, Westbrook, USA). L'appareil est placé dans un petit laboratoire climatisé.

Les paramètres mesurés sont :

- **pH sanguin**
- **pCO<sub>2</sub>** (mm Hg)
- **Ionogramme (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>)** (mmol.l-1)

A partir des paramètres mesurés, l'analyseur calcule les paramètres suivants :

- la concentration en ions bicarbonates [ $\text{HCO}_3^-$ ] :

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

- la teneur en  $\text{CO}_2$  totale  $\text{tCO}_2$  :

$$\text{tCO}_2 = [\text{HCO}_3^-] + 0,03 * \text{pCO}_2$$

- le trou anionique **AnGap** (Anion Gap) :

$$\text{AnGap} = ([\text{Na}^+] + [\text{K}^+]) - ([\text{Cl}^-] + [\text{HCO}_3^-])$$

#### **1.4.1.2. Paramètres métaboliques**

D'autres paramètres biochimiques sont également mesurés :

- **l'ammoniémie**
- **l'urémie**
- **la glycémie**

Selon l'heure de la collecte :

- le tube de sang hépariné est placé dans de la glace pilée puis l'analyse effectuée dans les 15 minutes suivantes, au laboratoire de l'ENVT,
- le tube est centrifugé (10 minutes à 4000g) dans les 10 minutes, puis le plasma est aliquoté et placé dans la glace, avant de le congeler à  $-18^\circ\text{C}$  après 30 minutes maximum. Cette alternative est utilisée en dehors des horaires d'ouverture du laboratoire de l'ENVT (soit pour le point H18). Les échantillons sont analysés le lendemain matin avec les prélèvements du point H8.

#### **1.4.1.3. Archivage**

Deux tubes de sang supplémentaires (1 tube sec et 1 tube hépariné) sont prélevés à chaque point de collecte, puis centrifugés (10 minutes à 4000g) dans les 5-10 minutes qui suivent. Les sera et plasmas sont fractionnés en 2 parties aliquotées, puis congelés dans les 30 minutes suivant la ponction.



#### 1.4.1.4. *Autres paramètres biochimiques*

Au cours de la semaine précédant chaque session, un tube de sang prélevé dans un tube héparinate de Li à billes est prélevé sur chaque bœuf, afin de doser les paramètres suivants (dosages réalisés au Laboratoire NBVC) :

- **Zinc (Zn)**
- **Cuivre (Cu)**
- **Gluthation peroxydase (GSH-Pxe)**
- **Iode (I)**
- **T4**
- **Acides gras non estérifiés (AGNE)**
- **Béta-hydroxy-butyrate (BOHB)**

#### 1.4.2. **Immunologie**

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

Les ponctions pour les tests immunologiques ont lieu tous les jours en parallèle des autres prélèvements (voir annexe 2) à 9h, soit 1h après la distribution de la ration. Le sang est prélevé :

- pour les tests sur les neutrophiles : dans des tubes Vacutainer de 7 mL (n = 7 tubes) contenant de l'ACD (Becton-Dickinson) ; les tubes sont retournés 5 fois pour homogénéiser le contenu puis sont immédiatement placés dans de la glace pilée jusqu'à l'étape de purification des neutrophiles
- pour réaliser les hémogrammes : dans 1 tube EDTA, en même temps que les tubes ACD.

## **1.5. Analyses immunologiques**

Avant d'évaluer les fonctions neutrophiliques, les GNN sont au préalable séparés des autres cellules sanguines. La pureté des cellules purifiées et leur viabilité sont ensuite évaluées par cytométrie en flux.

### **1.5.1. Préparation des cellules**

#### ***1.5.1.1. Séparation et purification des neutrophiles***

La séparation des neutrophiles se fait par centrifugation (séparation des granulocytes, des érythrocytes et des leucocytes mononucléés). Les granulocytes sont ensuite purifiés par lyse des érythrocytes résiduels grâce à une solution saline hypotonique.

Le protocole de purification complet est présenté en Annexe 3.

#### ***1.5.1.2. Comptage des cellules***

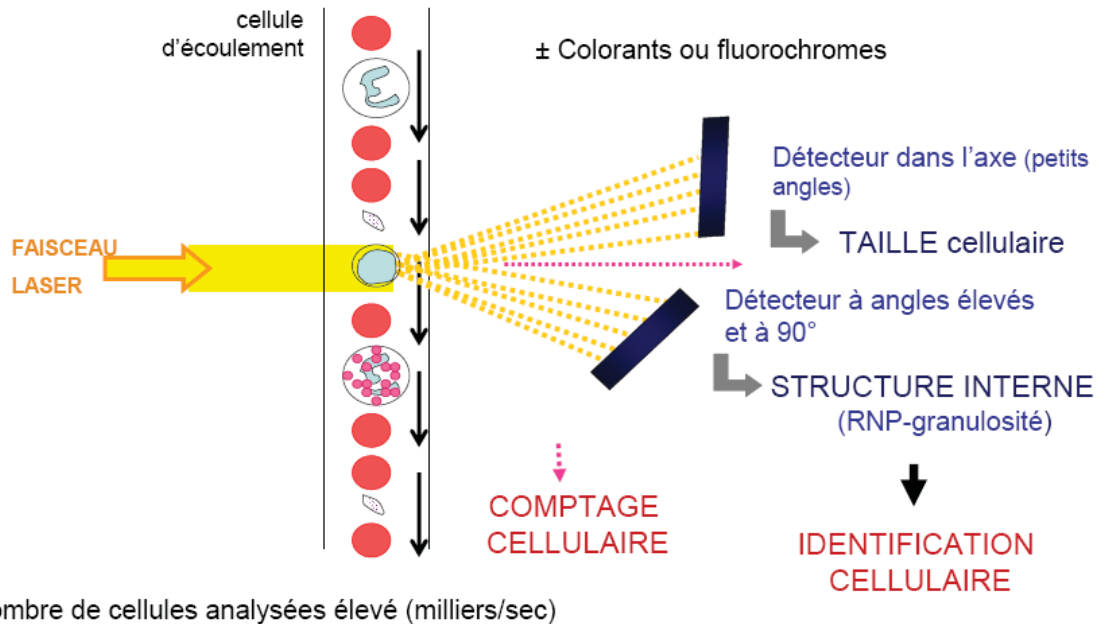
Les granulocytes, reconnaissables grâce à leur noyau segmenté, sont comptés à l'aide d'une lame de Malassez. La concentration en cellules (neutrophiles + éosinophiles éventuellement contaminants) est ajustée à la concentration de  $5.10^6$  cellules.ml<sup>-1</sup> de HBSS. Les cellules sont conservées sur la glace jusqu'au début des tests fonctionnels.

#### ***1.5.1.3. La cytométrie en flux : principe et utilisation***

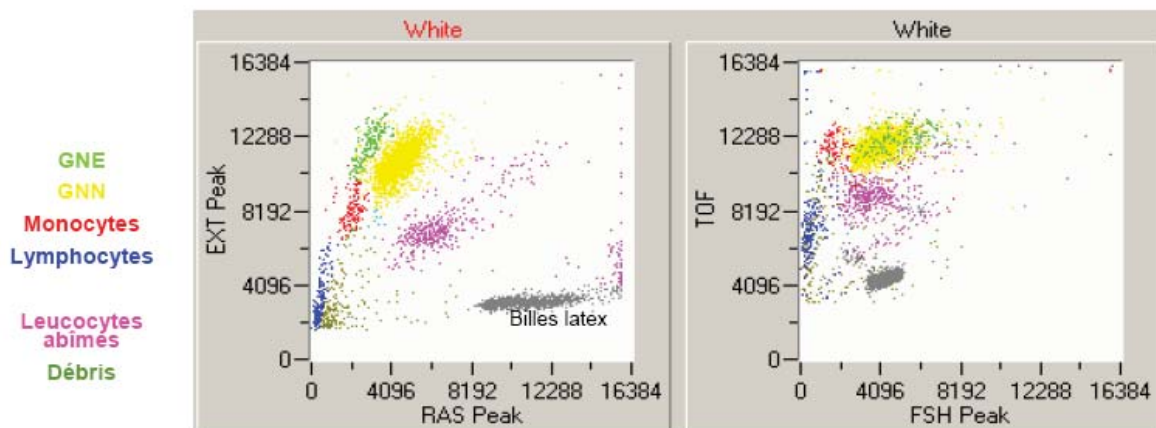
L'expression des marqueurs membranaires (utilisée afin d'identifier les neutrophiles et d'évaluer certaines de leurs fonctions), la viabilité et la pureté des neutrophiles sont mesurées par cytométrie en flux.

### i. Principe de la cytométrie en flux

Cette méthode permet d'analyser les propriétés des cellules en les exposant une à une à un faisceau laser (voir figure 17). Des capteurs permettent d'analyser les propriétés de la lumière diffractée et émise par les cellules, ainsi que la fluorescence des anticorps marqués.



**Figure 17** : Illustration du principe de cytométrie en flux (d'après Bourgès-Abella 2008)



**Figure 18** : Cytogramme obtenu par cytométrie en flux (d'après Bourgès-Abella 2008).

Chaque population de cellules est représentée par un nuage de point coloré : les neutrophiles sont en jaune.

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.

La lumière diffractée par les cellules permet :

- grâce aux détecteurs dans l'axe de mesurer la taille cellulaire (paramètre Forward Scatter = **FSC**)

- grâce aux détecteurs à angles élevés de déterminer la structure interne des cellules (granulosité...) (paramètre Side Scatter = **SCC**).

Le dispositif mesure le nombre de cellules qui passent dans le système de détection et les identifie en fonction de leurs caractéristiques (taille, morphologie, granulosité), et calcule la proportion des différentes populations cellulaires.

Chaque cellule est représentée par un point sur le cytogramme (figure 18). L'échantillon est donc visualisé sous la forme d'un nuage de points.

## **ii. La cytométrie en flux : applications**

L'utilisation d'anticorps couplés à des fluorochromes permet de détecter la présence de marqueurs à la surface des cellules et d'en estimer l'abondance. Par exemple, l'incubation avec des anticorps anti-CD11b fluorescents permet d'identifier les neutrophiles.

Les agents intercalants peuvent aussi être utilisés. Ainsi, l'iodure de propidium (**IP**), qui pénètre dans les cellules mortes, permet de déterminer la viabilité des cellules purifiées.

### **1.5.2. Analyse de l'expression des récepteurs membranaires CD11b et CD62L**

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

Des solutions indépendantes d'anticorps anti-CD11b et anti-CD62L sont préparées la veille de l'essai. Les cellules sont incubées avec les anticorps liés à un fluorochrome. La fluorescence des neutrophiles qui est alors proportionnelle à la quantité d'anticorps fixés sur les cellules est mesurée grâce au cytomètre.

Chaque marquage est réalisé en triplicate. La moyenne des trois valeurs de chaque série a été exploitée.

Trois tubes servent de contrôle :

- Témoin négatif : tube ne contenant que la solution HBSS

- Témoins positifs : deux tubes sont des simples marquages respectivement CD11b ou CD62L pour le réglage du cytomètre (compensation des fluorescences).

Le protocole complet est présenté en Annexe 4.

### **1.5.3. Analyse des fonctions cellulaires**

#### ***1.5.3.1. Préparation du zymozan activé***

En tant qu'activateur des GNN, du zymozan activé a été préparé au préalable selon la méthode décrite par *Roth et Karberle (1981)*. Le zymozan est purifié à partir de la paroi de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Il s'agit d'un polymère glucidique et protéique insoluble, qui se lie aux récepteurs TLR2 et Dectin-1. La préparation de particules de zymozan opsonisées (OZP) servira à mimer la reconnaissance d'un agent pathogène opsonisé. L'opsonisation est réalisée avec des anticorps et du complément contenus dans le sérum bovin.

Le protocole complet est présenté en Annexe 5.

#### ***1.5.3.2. Mesure de la production de radicaux libres***

La production de radicaux libres est mesurée par un test de chimioluminescence au luminol. Les neutrophiles purifiés sont mis en contact dans le puits d'une plaque de culture, avec un activateur (OZP ou PMA) et un substrat émetteur de photons, le luminol (voir figure 13 pour le mécanisme).

Le protocole complet est présenté en Annexe 6.

Des puits ne contenant que du substrat permettent de déterminer la luminescence propre du luminol (No Cell). Une autre ligne de puits sans activateur (« blanc technique ») a été utilisée comme témoin négatif (No Stim).

Les résultats bruts de chimioluminescence ont été corrigés par soustraction :

- de la valeur moyenne des puits « No Cell » dépourvus de cellules afin de supprimer le bruit de fond

- des valeurs du blanc technique, soit de la valeur de chimioluminescence des puits sans activateur « No Stim » ; cette valeur représente la production spontanée de radicaux libres (niveau de base).

La valeur retenue pour chaque cycle correspond à la moyenne des valeurs d'une série de trois puits. Quelques valeurs aberrantes ont été écartées.

Finalement, la valeur de chimioluminescence retenue pour chaque couple individu – activateur est la moyenne des 24 valeurs obtenues au cours d'une date de mesure.

#### **1.5.4. Analyse de la bactéricidie**

L'analyse de bactéricidie est un test dont le but est d'évaluer la capacité globale des neutrophiles à tuer les bactéries présentes à leur contact sans cibler un mécanisme en particulier. La bactéricidie est évaluée grâce à un test d'oxydo-réduction et une méthode utilisant une réaction colorimétrique (mesure de la densité optique).

Une suspension de *Staphylococcus aureus* dont la concentration initiale est connue est mise en présence des neutrophiles dans des puits d'une plaque 96-puits. En parallèle, des dilutions sériées de la suspension bactérienne sont effectuées afin de réaliser une courbe standard de concentration bactérienne connue.

Un substrat coloré dont le changement de couleur est proportionnel à la quantité de bactéries vivantes présentes dans le puits est ensuite ajouté. La densité optique est ensuite mesurée à 560 nm.

Le Protocole complet est présenté en Annexe 7.

La courbe standard de dilution permet de déterminer une relation précise entre le nombre de bactéries vivantes et la densité optique mesurée. Cette relation est déterminée à chaque analyse, et permet de définir le nombre de bactéries vivantes résiduelles après incubation avec les neutrophiles.

Le pourcentage de bactéricidie correspond au rapport suivant :

$$\text{Bactéricidie (\%)} = [(1.10^8 - n) / 1.10^8] \times 100$$

Les mesures ont été réalisées dans quatre puits en parallèle. Après exclusion de quelques valeurs aberrantes, le résultat retenu est la moyenne des quatre pourcentages de bactéricidie obtenus pour chaque animal.

## **1.6. Analyses statistiques**

Les effets statistiquement significatifs ont été évalués à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) avec le logiciel R® 2.9.2 ; plusieurs modèles ont été utilisés selon les facteurs étudiés.

Tout d'abord nous avons étudié l'effet du régime sur les fonctions neutrophiliques (« effet Ration »). Ensuite, un modèle a permis d'évaluer les effets cumulatifs des paramètres biochimiques en prenant comme valeur l'aire sous la courbe (voir Annexe 8 pour la méthode de calcul) de la cinétique du paramètre étudié.

Un autre modèle statistique a été utilisé pour étudier les effets instantanés de l'ammoniémie et de l'urémie, dont les valeurs utilisées étaient celles obtenues au moment de l'analyse au temps H9 (valeur point ou Pt).

Enfin, un dernier modèle a permis d'évaluer les éventuelles interactions entre paramètres biochimiques, afin de vérifier la dépendance ou l'indépendance de deux paramètres biochimiques ayant le même effet sur les fonctions neutrophiliques.

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

### **1.6.1. Effet Ration**

#### ***1.6.1.1. Sur les paramètres immunologiques et biochimiques cumulatifs***

Le modèle utilisé est le suivant :

$$[Y = \mu + \text{Animal} + \text{Session} + \text{Ration} + \varepsilon]$$

avec Y = variable (paramètre immunologique ou biochimique cumulatif),  $\mu$  = moyenne de la variable étudiée, Animal = facteur individu (bœufs A, B, C ou D), Session = facteur séquence de prélèvements (1 ou 2), Ration = facteur ration (14 ou 20 % MAT), et  $\varepsilon$  = variation propre à chaque donnée (résidus).

Les paramètres « cumulatifs » sont les paramètres biochimiques mesurés en cinétique journalière (ammoniac, urée, glucose, pH, pCO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub>, Trou Anionique, K, Na, Cl). La valeur de l'aire sous la courbe a été prise en compte pour les analyses biochimiques.

### **1.6.1.2. Sur les paramètres biochimiques ponctuels**

Cet effet concerne les paramètres biochimiques mesurés une seule fois par animal et par session : oligo-éléments (Cu, Zn, I, GSH-Px), produits du métabolisme énergétique (AGNE, BOHB) et T4. Le modèle utilisé sépare les facteurs :

$$[Y = 1 + \text{Ration} + \text{Session} + \varepsilon]$$

et

$$[Y = 1 + \text{Ration} + \text{Animal} + \varepsilon]$$

avec Y = variable (paramètre biochimique)

### **1.6.2. Effet d'un paramètre biochimique**

Cet effet concerne les paramètres biochimiques cumulatifs et ponctuels. On utilise le modèle suivant :

$$[Y = \mu + \text{Animal} + \text{Session} + \text{Biochimie} + \varepsilon]$$

avec Y = variable (paramètre immunologique), Biochimie = facteur biochimique (16 paramètres biochimiques différents).



### 1.6.3. Effet instantané

Le modèle utilisé est le suivant :

$$[Y = \mu + \text{Animal} + \text{Session} + \text{BiochimiePt} (\mu' + \text{Animal} + \text{Session}) + \varepsilon]$$

avec Y = variable (paramètre immunologique), BiochimiePt = facteur biochimique (valeur du point H9 de l'urémie ou ammoniémie).

### 1.6.4. Interaction entre paramètres biochimiques cumulatifs

$$[Y = \mu + \text{Animal} + \text{Session} + \text{Biochimie} + \varepsilon]$$

avec Y = variable (facteur biochimique cumulatif), et Biochimie = facteur biochimique.  
Pour ce modèle, il a uniquement été étudié l'interaction entre paramètres biochimiques mesurés en cinétique journalière.

Pour la suite, nous considérerons que les facteurs étudiés ont un effet significatif si la valeur  $p$  calculée par le logiciel R est inférieure à 0,05.

## **2. Résultats**

Cette partie présente les résultats des analyses hématologiques, biochimiques, et des tests des fonctions neutrophiliques déjà présentés précédemment (voir paragraphe 1.5. du chapitre précédent).

L'objectif étant d'évaluer l'impact de l'apport azoté de la ration sur les fonctions des GNN, nous présentons tout d'abord les résultats des mesures de biochimie sanguine réalisées, en particulier l'impact de la ration sur les métabolites de l'azote (urée et ammoniac). Puis nous évaluerons l'effet de la ration sur le nombre de neutrophiles circulants et sur les caractéristiques cellulaires, qu'elles soient constitutives (expression de différents récepteurs qui ont permis en outre de vérifier la pureté des fractions isolées), ou fonctionnelles (en relation avec les propriétés bactéricides).

### **2.1. Description des paramètres biochimiques**

En parallèle de la mesure des paramètres immunologiques, nous avons réalisé des mesures de différents métabolites sanguins afin d'évaluer les différences de concentration liées à la quantité de MAT de la ration. Différents paramètres biochimiques (urée, ammoniac, glucose, Na, K, Cl, pH, pCO<sub>2</sub>) ont été mesurés en cinétique journalière chaque fois que des prélèvements étaient réalisés pour évaluer les fonctions immunologiques des neutrophiles (voir calendrier expérimental en Annexe 2). En outre, d'autres paramètres biochimiques (oligo-éléments, corps cétoniques, ...) ont été mesurés ponctuellement au cours de la deuxième semaine de chaque session.

#### **2.1.1. Cinétique de l'ammoniémie et de l'urémie**

La différence entre les deux rations résidant dans l'apport de MAT, nous allons détailler les résultats correspondant aux dosages des métabolites de l'azote : l'ammoniac et l'urée sanguins.

Les valeurs de l'ammoniémie varient fortement selon l'individu et le régime : les valeurs sont comprises entre 4 et 120  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , pour des valeurs usuelles (VU) se situant entre 23 et 35  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  (Ferguson 1989). Les valeurs mesurées sont très éloignées de celles correspondant à une intoxication à l'ammoniac qui sont chez la vache laitière de l'ordre de 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  de sang veineux (Symonds 1981).



**Figure 19** : Variations de l'ammoniémie en fonction de l'animal au cours du premier jour de la session 1 (A) et variations moyennes de l'ammoniémie au cours du premier jour des 2 sessions en fonction de la ration (B) (logiciel Excel®).

Sur la figure A ration 1 pour les individus A et C, ration 2 pour B et D.

Les VU de l'urémie chez les bovins sont comprises entre 2,0 et 7,5  $\text{mmol.l}^{-1}$  (Radostis 2007). Au cours de notre essai, les valeurs de l'urémie sont comprises entre 3,1 et 7,8  $\text{mmol.l}^{-1}$  pour la ration 1 (14% MAT) ; celles des bœufs nourris avec la ration 2 (20% MAT)

présentaient des valeurs régulièrement supérieures à 7,5 mmol.l-1 au cours de la journée, sans toutefois dépasser 10 mmol.l-1. Comme variable explicative de la variation de l'urémie, on note un effet Animal marqué. En effet, une différence d'au moins 0,5 mmol.l-1 à chaque point entre A et C d'une part, et B et D d'autre part (bœufs ingérant la même ration) a été constatée.

**A**

**B**

**Figure 20 : Variations de l'urémie en fonction de l'animal au cours du premier jour de la session 1 (A) et variations moyennes de l'urémie au cours du premier jour des 2 sessions en fonction de la ration (B)**

(logiciel Excel®)

Sur la figure A ration 1 pour les individus A et C, ration 2 pour B et D.

On observe un pic d'ammoniémie (figure 19B) une heure après l'ingestion de la ration (point H9) chez tous les animaux ; la courbe ne s'infléchit qu'après H10 pour les bœufs nourris avec la ration à 20% de MAT. Globalement, ammoniémie et urémie évoluent en

parallèle. D'autre part, on observe une plus forte élévation suivie d'une plus lente diminution des valeurs de l'urémie chez les animaux recevant la ration à 20% par rapport à la ration à 14% de MAT.

### **2.1.2. Mesures des autres paramètres biochimiques**

Les valeurs de la glycémie sont comprises entre 2,9 et 4,7 mmol.l-1 (VU comprises entre 2,5 et 4,2 mmol.l-1). En dehors d'une baisse de la glycémie systématique suivant l'ingestion de la ration, les valeurs sont plutôt hautes pour tous les bœufs au cours des 2 sessions.

Les valeurs de BOHB, comprises entre 0,1 et 0,4 mmol.l-1, sont relativement basses (VU comprises entre 0,35 et 0,47 mmol.l-1).

La concentration maximale des acides gras non estérifiés sanguins était de 0,37 mmol.l-1, pour une VU maximale de 0,4 mmol.l-1 chez la vache laitière en période sèche.

Ces valeurs des paramètres du métabolisme énergétique (glycémie haute, BOHB et AGNE bas) indiquent que les deux rations couvrent les besoins énergétiques des animaux.

Le pH sanguin des animaux est assez stable au cours de l'expérimentation : les valeurs individuelles se situent entre 7,33 et 7,48 (VU entre 7,35 et 7,50). Au total seules 4 valeurs sont inférieures à la VU la plus basse, et concernent toutes l'animal A au cours de la session 1 (alors qu'il consomme la ration 2), dans les 3 heures suivant l'ingestion.

Bien que les valeurs usuelles de la pCO<sub>2</sub> (entre 34 et 45 mm Hg) soient plus élevées que celles mesurées au cours de notre étude, les résultats ont été relativement stables et homogènes d'un animal à l'autre : toutes les valeurs se situent entre 20 et 35 mm Hg.

Toutes les valeurs du bicarbonate sanguin sont dans l'intervalle des VU : entre 20 et 30 mEq.l-1. De plus, ces valeurs sont restées stables au cours de la journée et pour chaque animal. L'équilibre acido-basique sanguin des quatre animaux n'a donc pas été modifié au cours de notre étude.

La natrémie, variant de 134 à 150 mmol.l-1, est restée dans l'intervalle des VU (de 132 à 152 mmol.l-1) chez tous les animaux.

La kaliémie, comprise entre 1,9 et 4,9 mmol.l-1 est globalement basse (VU de 3,9 à 5,8 mmol.l-1), notamment chez le bœuf D. Cependant les valeurs sont relativement stables pour chaque animal à l'échelle de la journée et de la session.

La chlorémie mesurée est dans l'intervalle des VU (95 à 110 mmol.l-1), à l'exception d'une valeur haute (112 mmol.l-1 pour l'animal A, point H10, jour 2, session 2).

Les valeurs de l'iode mesurées (entre 40 et 68 µg.l-1) sont dans les VU (40 à 120 µg.l-1). Celles de la T4 sont plutôt basses : entre 49 et 65 nmol.l-1 pour des VU comprises entre 60 et 90 nmol.l-1. Les deux valeurs en dessous de la VU inférieure concernent les animaux C (49 nmol.l-1) et D (54 nmol.l-1) au cours de la session 2.

La concentration sanguine en GSH-Px se situe autour de 350 U/g Hb pour les animaux B, C et D (VU entre 150 et 400 U/g Hb) ; l'animal A présente des valeurs légèrement supérieures : 415 (session 1) et 443 U/g Hb (session 2).

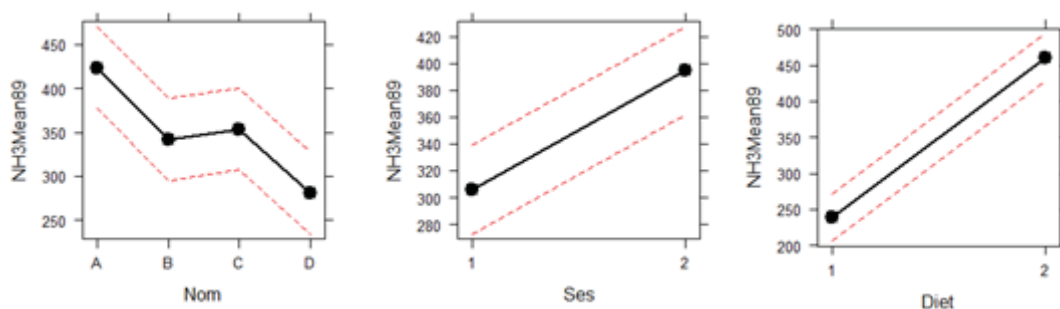
Les valeurs mesurées de la cuprémie (de 11,1 à 16,8 µmol.l-1) et de la zincémie (11,09 à 15,48 µmol.l-1) sont globalement basses sur les 4 animaux (VU respectives de 14 à 18 et de 15 à 18 µmol.l-1), sans aller en deçà du seuil de carence.

### 2.1.3. Effet de la ration sur les paramètres biochimiques

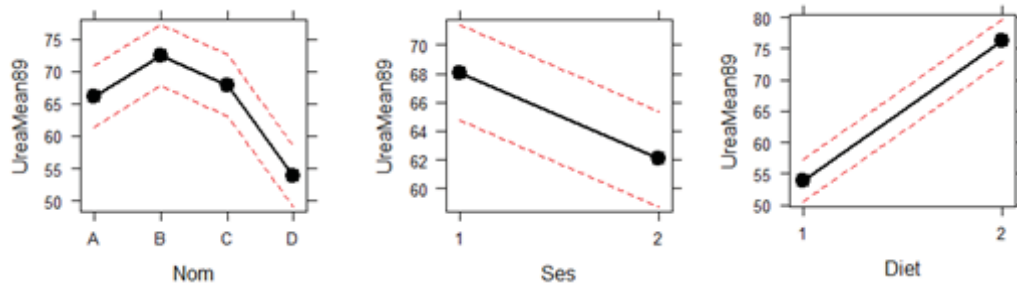
L'analyse statistique utilisant le modèle

$$[\text{Biochimie} = 1 + \text{Animal} + \text{Session} + \text{Ration} + \epsilon]$$

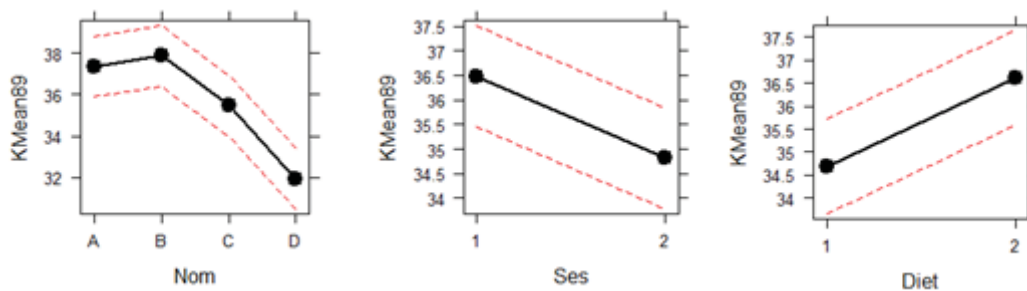
met en évidence une corrélation significative entre la variation de la teneur en MAT (effet Ration) et l'ammoniémie d'une part ( $p < 0,001$ ) (figure 21), l'urémie d'autre part ( $p < 0,001$ ) (figure 22), et de façon moindre la kaliémie ( $p < 0,05$ ) (figure 23). Ces trois corrélations sont associées à un effet Animal et Session.



**Figure 21 :** Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et Ration (Diet 1, 2) sur l'ammoniémie (NH3Mean89 en 0,1 mmol.l-1) (Logiciel R® 2.9.2)



**Figure 22** : Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et Ration (Diet 1, 2) sur l'urémie (UreaMean89 en 0,1 mmol.l-1) (Logiciel R® 2.9.2)



**Figure 23** : Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et Ration (Diet 1, 2) sur la kaliémie (KMean89 en 0,1 mmol.l-1) (Logiciel R® 2.9.2)

L'ammoniémie, l'urémie et la kaliémie augmentent lorsque la ration est riche en MAT. Cette augmentation est très marquée pour l'ammoniac (+ 100%), marquée pour l'urée (+ 50%), et faible pour le potassium (+ 5%).

Ainsi la comparaison des effets entre eux montre que l'ammoniac est le paramètre biochimique le plus sensible à l'apport en matière azotée (sa teneur sanguine est deux fois plus élevée à l'échelle de la journée avec la ration à 20% de MAT que la ration à 14%), suivi de l'urée, qui est deux fois moins sensible. Les métabolites de l'azote, et dans une moindre mesure le potassium, sont les seuls paramètres biochimiques dont la concentration évolue en fonction de l'apport en MAT.

Les graphes illustrent un effet Animal marqué, notamment pour l'urémie et l'ammoniémie où l'on a une différence de 30% entre l'individu D, et B ou A. L'effet Session est négatif et faible pour la kaliémie et l'urémie (5 et 10% de la variation respectivement entre les sessions 1 et 2), alors qu'il est positif et marqué pour l'ammoniémie.

## 2.2. Numération des neutrophiles et pureté après purification

### 2.2.1. Numération et formule leucocytaire

#### 2.2.1.1. Analyse globale

A chaque date de prélèvement, nous avons analysé la numération et la formule sanguine. Pendant toute l'expérimentation, les numérations leucocytaires sanguines restent dans l'intervalle des valeurs usuelles de l'espèce bovine.

Le pourcentage de GNN ne dépasse jamais la proportion de 45% du nombre total de leucocytes. La moyenne arithmétique de la numération des neutrophiles est de  $3,01.10^9$  cellules.l-1, avec un écart-type de 0,72. Le nombre de neutrophiles circulants au cours de l'essai est compris entre  $1,98.10^9$  et  $4,69.10^9$  cellules.l-1 (intervalle des valeurs usuelles entre  $0,6.10^9$  et  $4.10^9$  cellules.l-1, *Radostiis 2007*). Quatre valeurs sont au-dessus de la valeur supérieure de l'intervalle des valeurs usuelles, sans l'excéder toutefois de plus de 20% : trois valeurs au cours de la session 2 (deux chez l'animal D, les 2 premiers jours de l'essai ( $4,04$  et  $4,69.10^9$  cellules.l-1), une seule chez l'animal B ( $4,26$ ), et chez l'animal C ( $4,65$ )) au milieu de la session 1.

Les valeurs de numération sont donc suffisamment homogènes pour les inclure dans l'analyse statistique et utiliser les tests qui vont suivre.

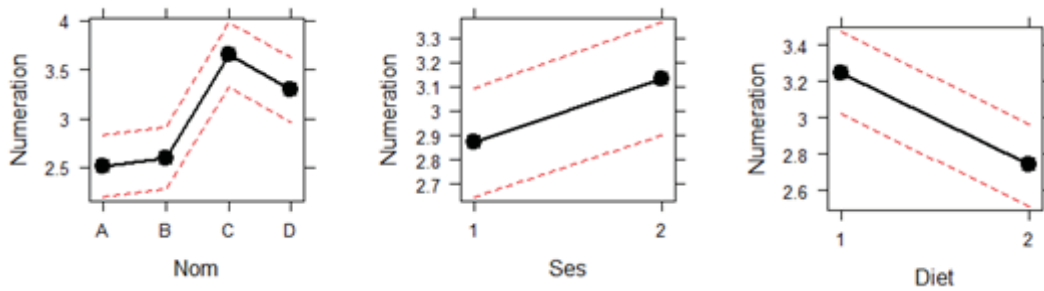
#### 2.2.1.2. Analyse en fonction des paramètres Animal, Session et Ration

L'analyse statistique selon le modèle

$$[\text{Numération} = 1 + \text{Animal} + \text{Session} + \text{Ration} + \epsilon]$$

met en évidence un effet Ration ( $p < 0,01$ ) associé à un effet Animal ( $p < 0,001$ ) significatifs sur le nombre de neutrophiles circulants (figure 24).





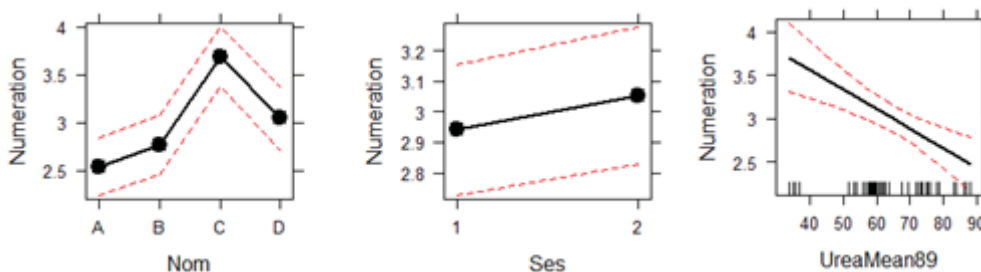
**Figure 24** : Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (1, 2) et Ration (Diet 1, 2) sur le nombre de neutrophiles circulants ( $10^9$  cellules.l-1 de sang) (Logiciel R® 2.9.2)

Malgré un effet Animal marqué, on remarque que plus la ration est riche en azote, moins il y a de neutrophiles circulants : il y a un écart de 15% entre les rations 1 et 2.

### 2.2.1.3. Analyse en fonction des paramètres biochimiques

L'étude statistique met en évidence plusieurs corrélations significatives :

➤ une corrélation négative entre le nombre de neutrophiles circulants et les paramètres sanguins suivants : urémie ( $p < 0,001$ ) (figure 25), ammoniémie ( $p < 0,05$ ) et kaliémie ( $p < 0,01$ )



**Figure 25** : Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et Urée (UreaMean89, 0,1 mmol.l-1) sur le nombre de neutrophiles circulants ( $10^9$  cellules.l-1 de sang) (Logiciel R® 2.9.2)

➤ une corrélation positive entre le nombre de GNN et les paramètres sanguins suivants : glycémie ( $p < 0,01$ ), concentration en BOHB ( $p < 0,001$ ) et cuprémie ( $p < 0,001$ ).

Tous les effets des paramètres biochimiques sont associés à un effet Animal.

Quantitativement, les effets de tous les paramètres biochimiques ont le même ordre de grandeur (entre 30 et 40%), et sont comparables aux variations dues à l'effet individuel.

## 2.2.2. Pureté des neutrophiles

### 2.2.2.1. Analyse globale

Les tests d'évaluation des fonctions neutrophiliques nécessitent une purification cellulaire préalable. En effet, la présence de populations cellulaires concomitantes peut modifier l'activité propre des neutrophiles. Par exemple, les éosinophiles contiennent dans leurs granules cytoplasmiques des protéines comme les catalases. Or celles-ci inhibent plus de 60% de la chimioluminescence induite par le PMA (*Rinaldi 2007*). D'autres protéines des éosinophiles, comme la protéine majeure basique, peuvent à l'inverse induire une augmentation de la chimioluminescence (*Moy 1990*).

D'autre part, on ne connaît pas les effets éventuels du régime (notamment l'influence de la quantité d'azote de la ration) sur les propriétés morphologiques et fonctionnelles des cellules sanguines. C'est pourquoi il est nécessaire de vérifier la pureté et la viabilité des neutrophiles obtenus après purification afin de vérifier que le régime alimentaire n'a pas d'effet sur cette étape et avant l'exploitation des données obtenues.

Les neutrophiles vivants sont identifiés avec un grand degré de certitude grâce à trois critères mesurés par cytométrie en flux :

- a) ajustement des fenêtres électroniques de taille et de granulosité : identification des cellules dont la taille et la granulosité correspondent à celles des neutrophiles
- b) analyse du marqueur CD11b à la surface des cellules (paramètre désigné CD11bpos dans les tableaux de données) ; le CD11b est une molécule fortement exprimée par les neutrophiles, mais aussi et de façon moindre par d'autres leucocytes comme les macrophages qui sont de cellules mononucléées et ne co-purifient pas ou peu avec les neutrophiles en suivant le protocole que nous avons choisi (*Tizard 2004*)
- c) marquage avec l'iodure de propidium : estimation de la proportion de cellules mortes dans l'échantillon (test de viabilité)

On peut ainsi mesurer précisément le pourcentage de neutrophiles présents dans l'échantillon.

Un résultat ne sera exploité par la suite que si individuellement :

- la viabilité est suffisamment élevée (> 90%)

- le pourcentage de cellules exprimant CD11b (CD11bpos) (condition b) et le pourcentage de la population de neutrophiles identifiée d'après des critères morphologiques (condition a) ont une différence inférieure à 5 %.

Après purification, les préparations de cellules obtenues ont les caractéristiques suivantes :

- une proportion moyenne de neutrophiles de 90,5% (médiane à 90,45%), avec un écart-type de 3,37 après exclusion d'une unique valeur basse de viabilité (56,1%) (Animal D, jour 3 de la session 1)
- une proportion de cellules CD11bpos toujours équivalente à celle de neutrophiles : l'écart moyen entre les 2 pourcentages est inférieur à 1, son maximum étant de 2,7. La moyenne globale de CD11bpos est de 90,5%
- une viabilité moyenne de 95,5%, avec un écart type de 2,69.

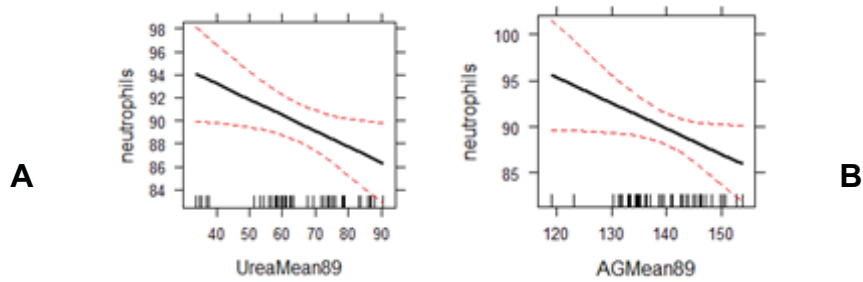
Ainsi, la pureté évaluée à partir des critères morphologiques ou l'expression du marqueur CD11b et la viabilité des cellules sont suffisamment homogènes et grandes pour la validation des échantillons et des résultats des différents tests d'évaluation des fonctions neutrophiliques.

#### ***2.2.2.2. Analyse en fonction des paramètres Animal, Session et Ration***

Statistiquement, aucun effet de la ration, de l'individu, ou de la session n'a été observé sur la pureté ou la viabilité des GNN, ainsi que sur l'expression du CD11b.

#### ***2.2.2.3. Analyse en fonction des paramètres biochimiques***

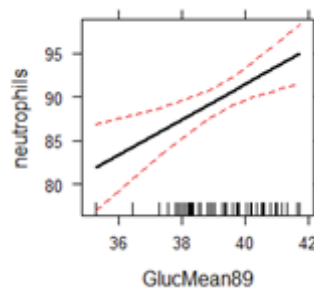
Une corrélation négative significative est observée entre les valeurs de l'urémie et la pureté des neutrophiles ( $p < 0,05$ ) (figure 26A) ; il en est de même pour le trou anionique ( $p < 0,05$ ) (figure 26B), malgré un effet Session significatif ( $p < 0,05$ ).



**Figure 26** : Effets de l'urée (UreaMean89, 0,1 mmol.l-1) (A) et du Trou Anionique (AGMean89, 0,1 mmol.l-1) (B) sur la pureté des neutrophiles (%) (Logiciel R® 2.9.2)

On constate qu'une augmentation de l'urémie ou du trou anionique, est associée à une diminution significative de la pureté de la fraction cellulaire obtenue, de l'ordre de 10% sur l'intervalle des valeurs sanguines mesurées. L'effet négatif du trou anionique est additionné d'un effet négatif significatif ( $p < 0,05$ ) sur la viabilité des GNN.

A l'inverse, il y a une corrélation positive significative entre la glycémie et la pureté des GNN ( $p < 0,01$ ) (figure 27).



**Figure 27** : Effet de la glycémie (GlucMean89, 0,1 mmol.l-1) sur la pureté des neutrophiles (%) (Logiciel R® 2.9.2)

La pureté varie de plus de 10% entre les valeurs basses et les valeurs hautes de la glycémie mesurée au cours de notre étude.

Parmi les paramètres biochimiques mesurés ponctuellement, on observe plusieurs corrélations :

- Le Cu et le GSH-Px ont un effet significatif ( $p < 0,05$ ) sur la pureté et CD11bpos : l'augmentation de chacun des deux paramètres entraîne une diminution de la pureté et de la proportion de cellules exprimant CD11b.
- Une corrélation significative ( $p < 0,01$ ) est aussi observée entre le béta-hydroxy-butyrat et la pureté des neutrophiles ainsi que le paramètre CD11bpos : une

augmentation des corps cétoniques va dans le sens d'une plus grande pureté des échantillons.

Le type cellulaire contaminant la préparation n'a pas été déterminé.

## **2.3. Expression des récepteurs membranaires**

### **2.3.1. Expression du marqueur CD62L**

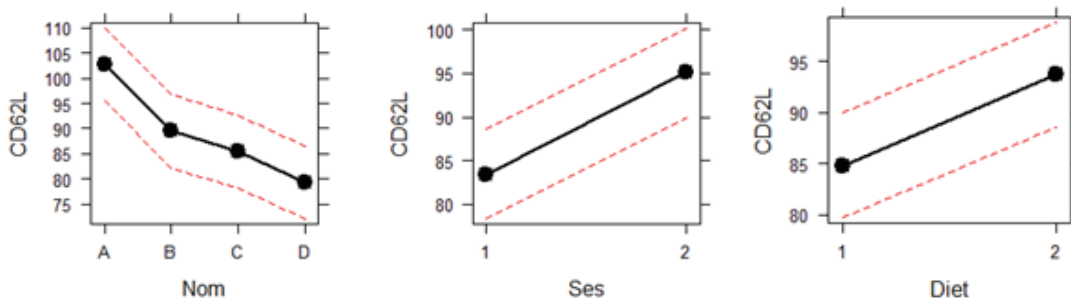
#### ***2.3.1.1. Analyse globale***

Les cellules ont été marquées à l'aide d'anticorps fluorescents (FITC) spécifiques de la L-sélectine (ou CD62L) avant l'analyse par cytométrie en flux. L'intensité moyenne de fluorescence permet d'estimer l'expression relative de ce marqueur à la surface des neutrophiles.

Les valeurs ponctuelles d'intensité moyenne de fluorescence (en **MFI** pour Mean Fluorescence Intensity) sont comprises entre 60 et 137 unités arbitraires, avec une moyenne globale de 89.

#### ***2.3.1.2. Analyse en fonction des paramètres Animal, Session et Ration***

Malgré des effets Animal et Session marqués, la ration présente un effet significatif sur l'expression du marqueur CD62L ( $p < 0,05$ ) (figure 28). Ces résultats suggèrent qu'une augmentation de l'apport azoté est en relation avec une plus grande expression de la L-sélectine à la surface des GNN.

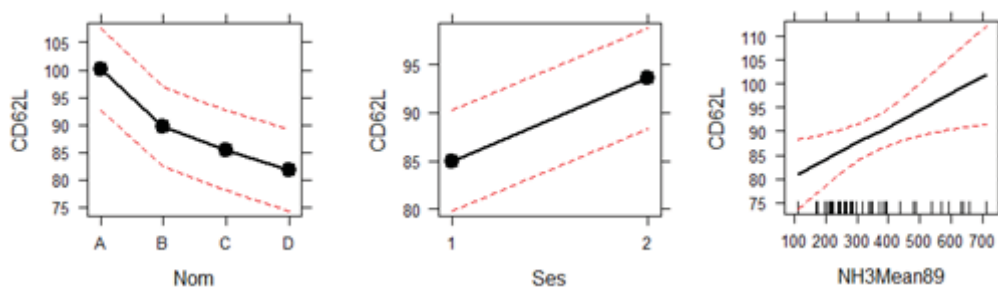


**Figure 28** : Effet Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et Ration (Diet 1, 2) sur l'expression de CD62L (MFI) (Logiciel R® 2.9.2)

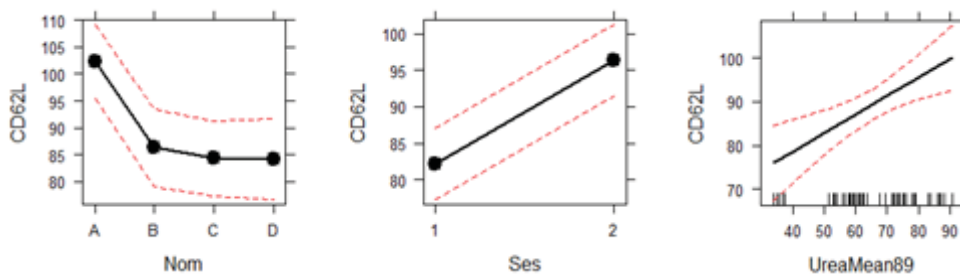
### 2.3.1.3. Analyse en fonction des paramètres biochimiques

L'analyse statistique met en évidence plusieurs corrélations significatives :

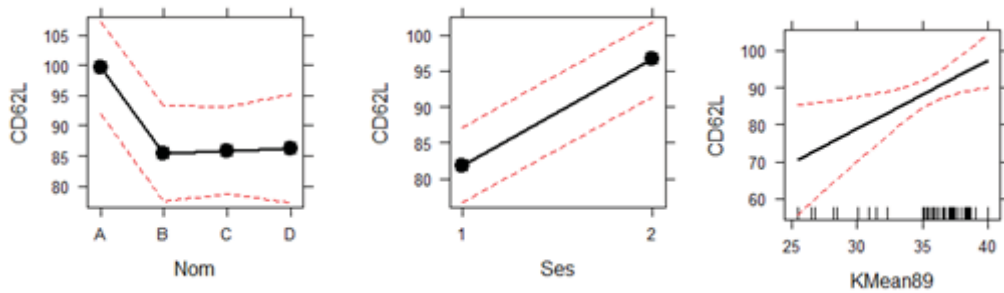
➤ Un effet positif de l'ammoniémie ( $p < 0,05$ ), de l'urémie ( $p < 0,01$ ), et de la kaliémie ( $p < 0,05$ ) sur l'expression de CD62L (figures 29, 30 et 31). Noter les effets significatifs des facteurs Animal et Session dans les 3 cas.



**Figure 29** : Effet Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et  $\text{NH}_3$  (NH3Mean89, 0,1 mmol.l-1) sur l'expression de CD62L (MFI) (Logiciel R® 2.9.2)



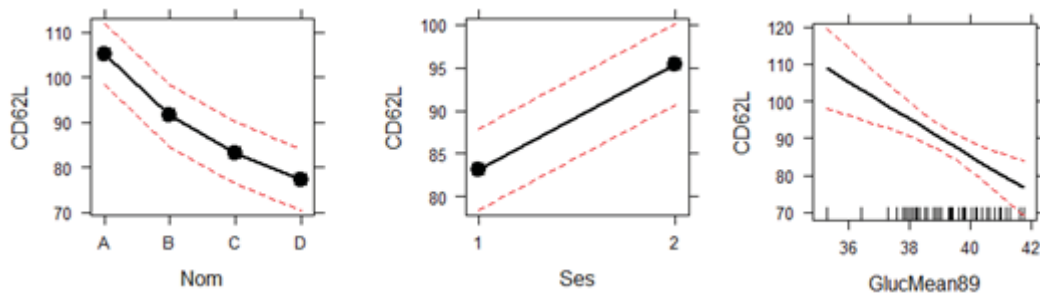
**Figure 30** : Effet Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et Urée (UreaMean89, 0,1 mmol.l-1) sur l'expression de CD62L (MFI) (Logiciel R® 2.9.2)



**Figure 31** : Effet Animal (A, B, C, D), Session (Ses 1 ou 2) et Potassium (Kmean89, 0,1 mmol.l-1) sur l'expression de CD62L (MFI) (Logiciel R® 2.9.2)

Les effets quantitatifs de l'urée, de l'ammoniac et du potassium sur l'expression de CD62L sont de l'ordre de 20%.

➤ Un effet négatif de la glycémie (figure 32) ( $p < 0,001$ ) sur l'expression de CD62L



**Figure 32** : Effet Animal (Nom A, B, C, D), Session (1, 2) et Glucose (GlucMean89, 0,1 mmol.l-1) sur l'expression de CD62L (MFI) (Logiciel R® 2.9.2)

Cet effet négatif est quantitativement plus élevé que précédemment puisqu'il est de l'ordre de 30%.

Parmi les paramètres biochimiques ponctuels, on observe :

➤ une corrélation positive significative ( $p < 0,001$ ) entre le cuivre et l'expression de CD62L, associée à un effet Animal et Session

➤ un effet négatif significatif du BOHB ( $p < 0,001$ ) et de la GSH-Px ( $p < 0,05$ ) sur le paramètre CD62L, associé à un effet Session pour les deux paramètres, et à un effet Animal pour le BOHB.

D'un point de vue quantitatif, les effets de chacun des paramètres biochimiques ont le même ordre de grandeur : il s'agit d'une variation de 30% environ entre les valeurs hautes et basses mesurées pour chacun des paramètres biochimiques.

L'analyse statistique de l'effet instantané des métabolites sanguins de l'azote (urée et NH<sub>3</sub>) selon le modèle

$$[Y = 1 + \text{Animal} + \text{Session} + \text{Biochimie Pt} (\mu' + \text{Animal} + \text{Session}) + \varepsilon]$$

ne permet pas de montrer un effet évident des valeurs Pt de l'ammoniac ou de l'urée sur l'expression de la L-sélectine : en effet, le sens des effets de l'interaction BiochPt x Ani n'est pas identique pour tous les animaux.

### **2.3.2. Expression du marqueur CD11b**

#### ***2.3.2.1. Analyse globale***

L'analyse de l'expression du marqueur CD11b est réalisée par cytométrie en flux après marquage avec un anticorps fluorescent anti-CD11b. L'intensité moyenne de fluorescence des cellules ainsi marquées est déterminée à chaque analyse.

Les valeurs ponctuelles de MFI pour le marqueur CD11b sont comprises entre 162 et 332 unités arbitraires, avec une moyenne de 227.

#### ***2.3.2.2. Analyse en fonction des paramètres Animal, Session et Ration***

L'analyse statistique ne met en évidence aucun effet Ration significatif. Toutefois des effets importants significatifs des facteurs Animal ( $p < 0,001$ ) et Session ( $p < 0,01$ ) sur l'expression de CD11b sont observés.

#### ***2.3.2.3. Analyse en fonction des paramètres biochimiques***

Aucun effet des paramètres biochimiques mesurés en cinétique (ou cumulatifs) n'est statistiquement significatif sur l'expression de CD11b.

Par contre, parmi les paramètres biochimiques ponctuels, on observe sur l'expression de CD11b membranaire, en association avec des effets Animal et Session significatifs :



- une corrélation positive significative du cuivre ( $p < 0,05$ ) et de GSH-Px ( $p < 0,01$ )
- une corrélation négative significative de BOHB ( $p < 0,01$ ).

L'effet le plus important est celui de la glutathion peroxydase : entre les valeurs basses et hautes de GSH-Px, la MFI augmente d'un facteur 4.

L'analyse des effets instantanés ne permet de conclure précisément sur l'effet des valeurs ponctuelles des métabolites de l'azote sur l'expression de CD11b : le sens de variation de l'interaction des paramètres BiochPt x Ani n'est pas uniforme pour les quatre animaux.

## **2.4. Les fonctions oxydatives des neutrophiles**

### **2.4.1. Analyse globale**

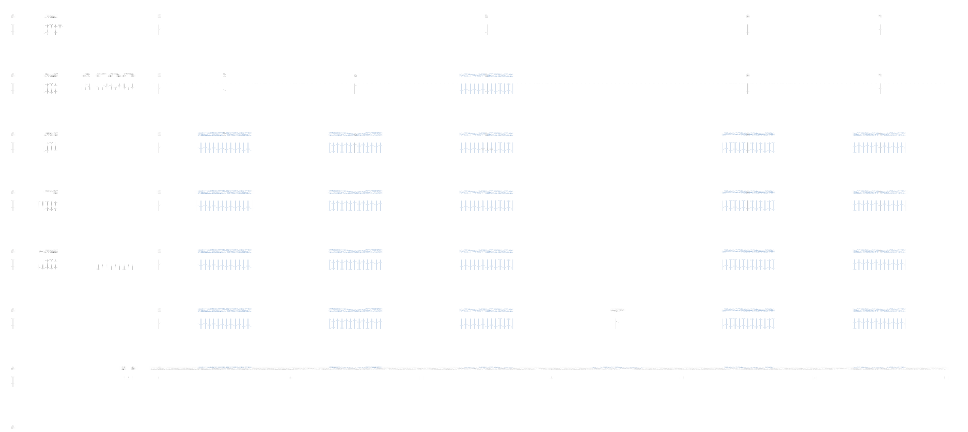
Les fonctions oxydatives des neutrophiles, en relation avec l'activation et la dégranulation, sont mesurées par chimioluminescence (CL) au luminol. Deux types d'activateur sont utilisés : le PMA et les particules de zymozan activé (OZP), aux concentrations suivantes :

- 0,01, 0,1 et 1  $\mu\text{M}$  pour le PMA
- 25, 80 et 250  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  pour l'OZP.

Quelle que soit la ration, les cellules ont réagi aux deux activateurs en produisant des FRO. N'ont été gardées que les valeurs exploitables, c'est-à-dire qui ont provoqué une production de FRO, corrélée à la chimioluminescence, significativement différente des valeurs des puits contrôle sans stimulation.

La concentration de 25  $\mu\text{g.l}^{-1}$  d'OZP n' a pas permis de stimuler les cellules de façon efficace et les résultats des puits correspondant à cette stimulation sont donc inexploitables, étant donné de nombreux résultats négatifs de chimioluminescence après soustraction des valeurs des puits No Stim et No Cell.

Pour les autres conditions d'activation, la CL globale a été comparable pour les deux types d'activation et à chaque concentration utilisée (moyennes globales entre 1300 et 1550 cpm), avec une meilleure homogénéité des résultats pour l'activation au PMA (figure 33).

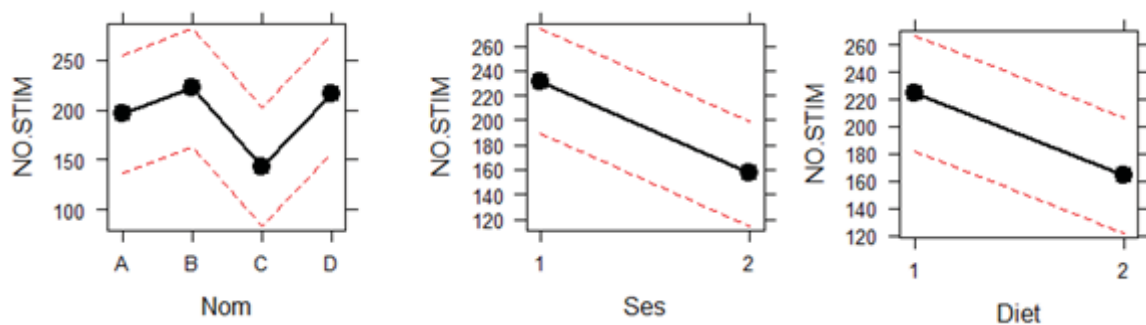


**Figure 33 : Chimiluminescence moyenne globale (cpm) en fonction des différentes concentrations d'activateur utilisées (Logiciel Excel®)**

Pour l'OZP, la concentration minimale d'activation est atteinte à partir de 80  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Pour le PMA, elle est atteinte à partir de 0,01  $\mu\text{M}$ , et les valeurs de chimiluminescence sont comparables aux deux concentrations supérieures.

#### 2.4.2. Analyse en fonction des paramètres Animal, Session et Ration

L'analyse statistique ne met en évidence aucun effet significatif de la teneur en MAT de la ration sur les fonctions oxydatives des neutrophiles activés par le zymozan ou par le PMA. Toutefois, on observe un effet Ration significatif sur la production de FRO des neutrophiles non activés (No Stim), en association avec un effet Session (figure 34).



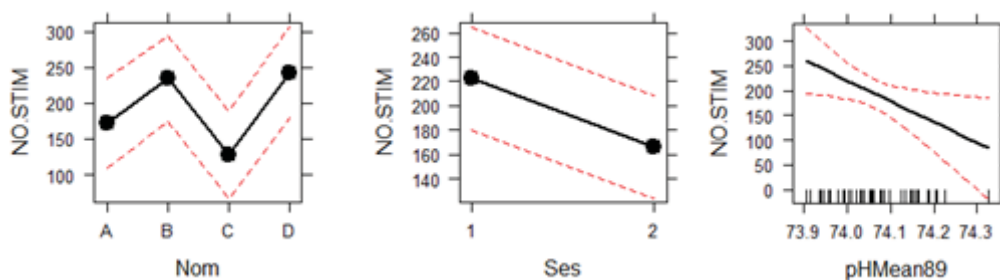
**Figure 34** : Effet Animal (Nom A, B, C, D), Session (1, 2) et Ration (Diet 1, 2) sur la production spontanée des FRO des neutrophiles (No Stim, MFI) (Logiciel R® 2.9.2)

L'augmentation de la MAT semble être à l'origine d'une diminution de la production de base de FRO en dehors de toute activation ; elle est de l'ordre de 25 % dans notre étude.

### 2.4.3. Analyse en fonction des paramètres biochimiques

#### 2.4.3.1. Hors stimulation

La production de base de FRO par les neutrophiles est significativement corrélée au pH sanguin des animaux ( $p < 0,05$ ), sans effet Animal ou Session associés (figure 35).

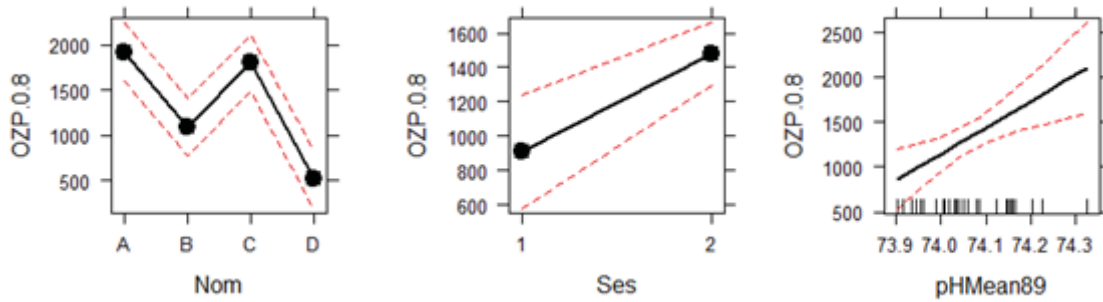


**Figure 35** : Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et pH (pHMean89, 0,1 unité) sur la production spontanée des FRO des neutrophiles (No Stim, MFI) (Logiciel R® 2.9.2)

Une augmentation du pH sanguin est liée à une diminution de la chimioluminescence spontanée des GNN, d'un facteur 2,5 dans notre étude.

### 2.4.3.2. Après stimulation avec OZP

L'analyse statistique met en évidence une corrélation positive significative entre le pH sanguin et la chimioluminescence des neutrophiles activés avec l'OZP aux concentrations de 80 ( $p < 0,01$ ) et 250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ), associés à un effet Animal et Session (figure 36).



**Figure 36 :** Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et pH (pHMean89, 0,1 unité) sur la chimioluminescence des GNN activés avec l'OZP à 80  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (OZP 0,8) (MFI) (Logiciel R® 2.9.2).

Pour les deux concentrations d'OZP, la chimioluminescence est augmentée d'un facteur 2 entre les valeurs basses et les valeurs hautes de pH de notre étude.

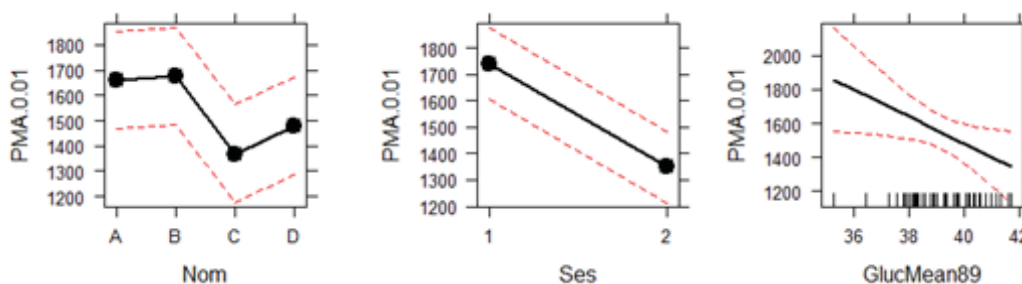
Aucun autre paramètre biochimique mesuré n'a d'effet sur la chimioluminescence des neutrophiles activés par le zymozan.

Aucun effet instantané évident de l'ammoniac ou de l'urée n'a été mis en évidence sur la réponse à la stimulation par l'OZP aux différentes concentrations.

### 2.4.3.3. Après stimulation avec le PMA

Aucun effet significatif des paramètres biochimiques sur la chimioluminescence des GNN activés au PMA à la concentration de 1  $\mu\text{M}$  n'est mis en évidence par l'analyse.

L'analyse statistique révèle une corrélation négative significative entre la glycémie et la production de FRO des GNN activés par le PMA à la concentration de 0,01  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) (figure 37).



**Figure 37** : Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et pH (pHMean89, 0,1 unité) sur la chimioluminescence des GNN activés avec le PMA à 0,01  $\mu\text{M}$  (PMA 0,01, en MFI) (Logiciel R® 2.9.2)

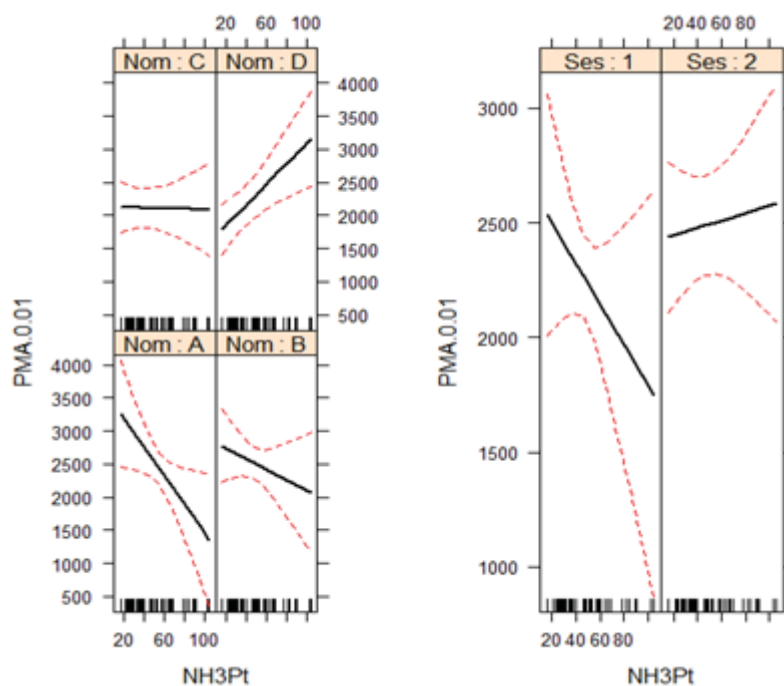
Quantitativement, cette diminution est de l'ordre de 20% entre les valeurs basses et valeurs hautes de glycémie mesurées dans notre étude.

Aucun autre paramètre biochimique mesuré en cinétique journalière n'a d'effet sur les neutrophiles activés avec le PMA.

Parmi les paramètres biochimiques mesurés ponctuellement, l'analyse statistique met en évidence :

- une corrélation positive significative sur la chimioluminescence des GNN activés avec le PMA de :
  - la Gluthation-Peroxydase, à la concentration de PMA de 0,1 ( $p < 0,05$ ) et 0,01  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ )
  - le Zinc, avec le PMA à 0,1 ( $p < 0,01$ ) et 0,01  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ )
  - l'Iode, avec le PMA à 0,1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ )
- une corrélation négative significative sur la chimioluminescence des GNN activés avec le PMA de :
  - BOHB, T4 et AGNE, avec le PMA à 0,1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ )

L'analyse statistique des effets instantanés met en évidence une corrélation négative significative de l'ammoniac (Pt) sur la chimioluminescence des GNN activés avec le PMA à 0,01  $\mu\text{M}$ . Toutefois, l'analyse du graphe ne permet pas de conclure quant à un effet certain puisque cette diminution n'est observée que sur 3 animaux sur 4 (figure 38).



**Figure 38** : Graphe des effets de l'interaction entre les facteurs  $\text{NH}_3$  instantané (NH3Pt) et Animal (Nom A, B, C, D) (à gauche) et de l'interaction entre les facteurs NH3Pt et Session (Ses 1, 2) (à droite) sur la chimioluminescence des GNN activés avec le PMA à 0,01  $\mu\text{M}$  (PMA 0,01, en MFI) (Logiciel R® 2.9.2)

## 2.5. Bactéricidie

### 2.5.1. Analyse globale

Les propriétés bactéricides des neutrophiles sont évaluées par la mesure des bactéries résiduelles après incubation avec un nombre connu de neutrophiles. Cette quantité est mesurée au moyen des propriétés oxydatives des bactéries et leur action sur un substrat qui change de couleur après réaction. Ainsi, la densité optique de l'échantillon permet de connaître cette quantité en la comparant aux valeurs d'une titration d'une quantité connue de bactéries, utilisée comme standard.

Les pourcentages de bactéricidie des neutrophiles sont compris entre 54,6% et 94,4% ; la moyenne de tous les prélèvements est de 86,16% avec un écart-type de 9,0.

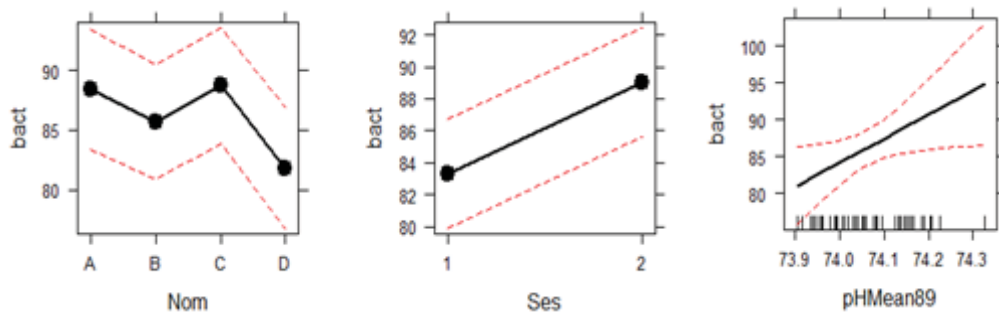
### 2.5.2. Analyse en fonction des paramètres Animal, Session et Ration

L'analyse statistique ne met en évidence qu'un effet Session significatif sur le pouvoir bactéricide des GNN : les facteurs Animal et Ration n'interviennent pas.

### 2.5.3. Analyse en fonction des paramètres biochimiques

Plusieurs corrélations statistiquement significatives ont été observées :

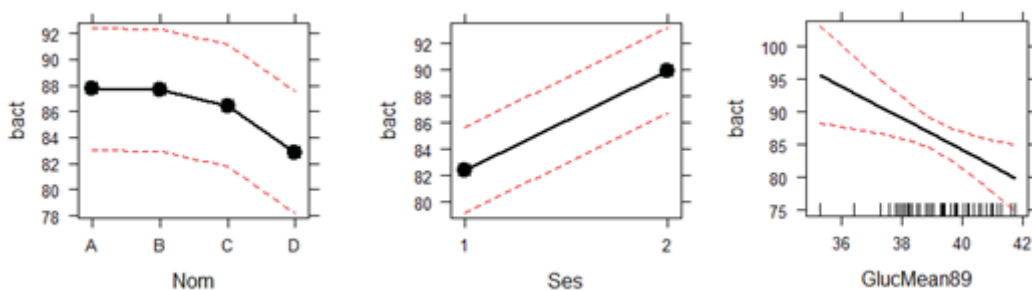
- Une corrélation positive avec le pH ( $p < 0,05$ ), à un effet Session (figure 39)



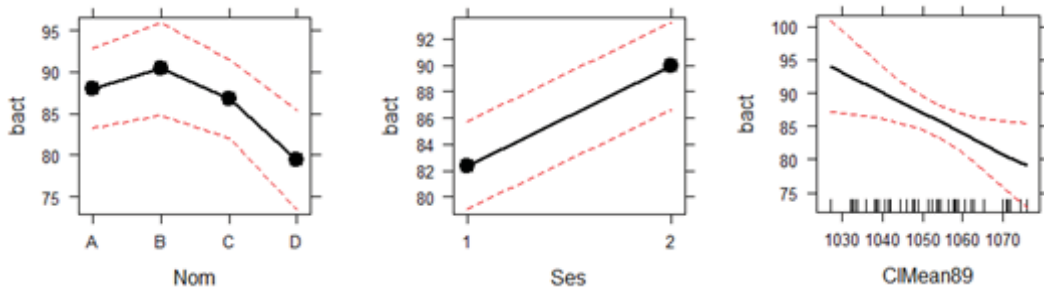
**Figure 39** : Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et pH (pHMean89, 0,1 unité) sur la bactéricidie (bact. %) (Logiciel R® 2.9.2)

L'effet du pH est marqué : il y a une différence de 15 % de bactéricidie entre les valeurs hautes et les valeurs basses de pH.

- Une corrélation négative associée à un effet Session avec le glucose ( $p < 0,01$ ) (figure 40), ainsi qu'avec le chlore ( $p < 0,05$ ) (figure 41).



**Figure 40** : Effets Animal (A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et glucose (GlucMean89, 0,1 mmol.l-1) sur la bactéricidie (bact. %) (Logiciel R® 2.9.2)



**Figure 41** : Effets Animal (Nom A, B, C, D), Session (Ses 1, 2) et chlore (ClMean89, 0,1 mmol.l-1) sur la bactéricidie (bact. %) (Logiciel R® 2.9.2)

Les effets inverses du glucose et du chlore ont un effet quantitativement équivalent sur le pouvoir bactéricide des neutrophiles : 15 % d'écart entre les valeurs hautes et basses de la glycémie et de la chlorémie.

Aucun effet instantané significatif n'a été mis en évidence sur le pouvoir bactéricide des neutrophiles sanguins.

## 2.6. Interactions entre les paramètres biochimiques

Jusqu'à présent, l'influence des paramètres biochimiques a été évaluée de manière individuelle. Cependant, dans l'organisme, les mécanismes de régulation concernent souvent plusieurs molécules à la fois, directement ou indirectement. Ainsi, plusieurs paramètres biochimiques peuvent être liés entre eux. Cette dépendance de paramètres les uns vis-à-vis des autres peut être à l'origine de biais dans l'interprétation statistique des effets : deux molécules dont la régulation est intimement liée peuvent présenter les mêmes effets quand un seul des deux paramètres est réellement impliqué. Par exemple, nous savons que le métabolisme du glucose et du potassium sont liés ; de même pour le pH et la pCO<sub>2</sub>, et bien sûr pour l'urée et l'ammoniac.

Il est donc essentiel de vérifier l'interaction des différents paramètres biochimiques deux à deux avant d'interpréter les résultats obtenus.



L'analyse statistique selon le modèle

$$[\mathbf{Bioch} = \mathbf{1} + \mathbf{Ani} + \mathbf{Ses} + \mathbf{Bioch} + \boldsymbol{\varepsilon}]$$

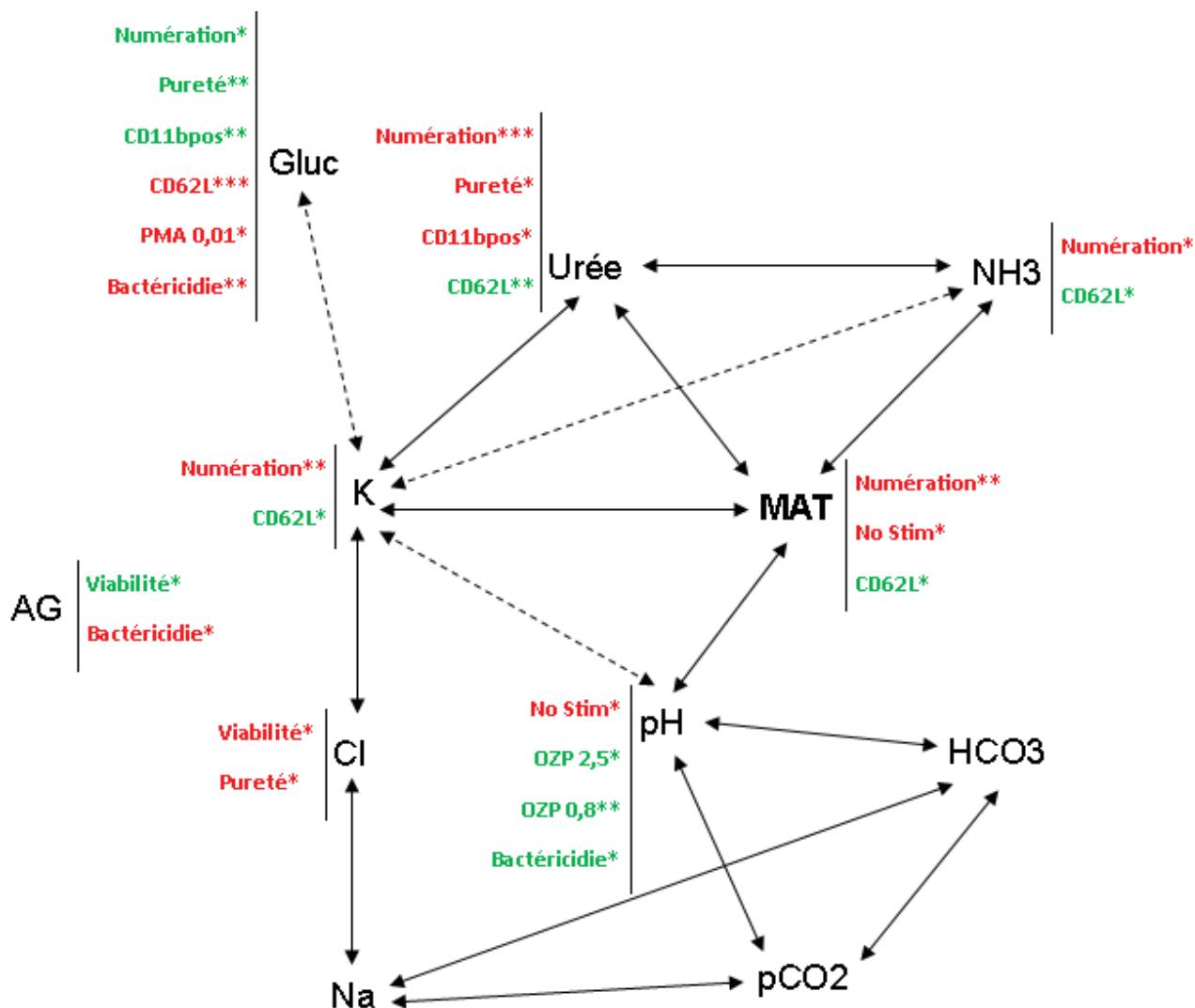
a mis en évidence :

- une interaction réciproque positive significative :
  - entre l'urée, l'ammoniac, en valeur cumulative ou point (instantanée)
  - entre l'urée, l'ammoniac et la ration
  - entre le pH, pCO<sub>2</sub> et HCO<sub>3</sub>
  - entre l'urée et le potassium
  - entre la ration et le potassium
- l'absence d'interaction significative entre tous les autres paramètres, notamment entre le glucose et le potassium.

Voir la figure 42 pour le bilan des interactions.

Deux paramètres biochimiques différents mais statistiquement liés qui ont le même effet cachent probablement un effet uni causal en réalité.

## 2.7. Bilan des effets



### Légende

Corrélation positive

Corrélation négative

← → Interaction significative ( $p < 0,05$ )

← - - - → Interaction non significative ( $p < 0,1$ )

\*, \*\*, \*\*\* Degré de significativité :  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$

**Figure 42** : Bilan des interactions entre paramètres biochimiques et de leurs effets sur les fonctions neutrophiliques

Numération = nombre de GNN circulants ; No Stim = production de FRO des GNN non activés ; OZP 2,5, OZP 0,8, PMA 0,01 = production de FRO des GNN activés respectivement avec l'OZP à 250 µg.ml-1, à 80 µg.ml-1 et avec le PMA à 0,01 µM ; CD11bpos = expression de CD11b à la surface des GNN ; CD62L = expression de L-sélectines à la surface des GNN.

### 3. Discussion et perspectives

L'objectif de cette étude est de déterminer si une augmentation de l'apport en azote soluble au-delà des recommandations et dans des proportions compatibles avec les rations qui sont distribuées habituellement dans les élevages, conduit à une modification des fonctions des neutrophiles sanguins chez les bovins.

Comme nous l'avons décrit dans la partie introductive, il est communément admis que lors de ration avec un excès azoté (exemple de la mise à l'herbe au printemps où les apports en azote soluble de la ration augmentent brutalement), l'incidence des pathologies d'origine infectieuse augmente, en relation avec une possible altération de l'efficacité de la réponse immunitaire des animaux.

Peu d'études ont analysé ce phénomène et la relation entre la teneur en MAT de la ration et une diminution des fonctions immunitaires. Les neutrophiles constituant un des premiers moyens de défense vis à vis des infections bactériennes, nous avons choisi d'investiguer cette possible modulation de la réponse immunitaire en évaluant leurs fonctions.

Précédemment, des études ont été conduites dans le but d'étudier les fonctions des neutrophiles sanguins lors d'excès d'azote chronique, en analysant les capacités de diapédèse et de phagocytose d'une part (*De Marchi 2010*), et la fonction bactéricide des GNN bovins d'autre part (*Millet 2010*). Ces travaux ayant conclu à un rôle probable d'un excès chronique d'azote soluble dans l'altération de l'immunité des animaux par un effet sur la production des radicaux libres et sur les étapes d'attachement, de diapédèse et de phagocytose, nous avons choisi de poursuivre ce projet en étudiant ces fonctions à la phase aiguë, juste après le changement de la proportion d'azote dans la ration.

Nous avons étudié les fonctions neutrophiliques grâce aux paramètres suivants : la capacité d'adhésion à l'endothélium vasculaire, la production de radicaux libres, et le pouvoir bactéricide. Pour cela, nous avons réalisé des tests immunologiques *ex vivo* à partir d'échantillons sanguins effectués sur quatre bovins consommant deux rations iso-énergétiques dont la teneur en MAT diffère : 14 et 20 % de MAT mesurée sur la matière sèche. Les fonctions neutrophiliques ont été évaluées après purification des neutrophiles, pour s'affranchir de l'interférence possible des autres types cellulaires.

En parallèle, les analyses biochimiques réalisées en vis-à-vis des analyses immunologiques ont permis de rechercher des corrélations entre les paramètres biochimiques mesurés et les

variations des fonctions neutrophiliques. L'interprétation de ces données est cependant délicate ; pour préciser les effets, il est nécessaire d'évaluer auparavant l'effet de la ration sur tous les paramètres biochimiques mesurés, afin de confirmer que la teneur en MAT choisie est bien à l'origine de changements biochimiques, dont on suppose qu'ils sont susceptibles de modifier les fonctions immunitaires.

Les paramètres biochimiques analysés dans le sang à différents moments de la journée après la distribution de la ration sont les principaux composés du métabolisme protéique, énergétique, de l'homéostasie électrolytique et du pH sanguin :

- ammoniac et urée pour le métabolisme azoté
- glucose (et ponctuellement BOHB et AGNE) pour le métabolisme énergétique
- les ions (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>) pour l'équilibre électrolytique
- pH, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, pCO<sub>2</sub>, et le trou anionique pour l'équilibre acido-basique.

Plusieurs publications décrivent les effets de certains oligo-éléments sur les fonctions immunitaires des bovins (*Spears 2000, Galyean 1999*). Nous avons pour cette raison jugé opportun de doser ponctuellement (une fois au cours de la deuxième semaine de chaque session) certains d'entre eux, tels que le Cuivre, le Zinc, l'Iode et l'hormone thyroïdienne T4, et la glutathion-péroxydase GSH-Px (sélénium).

Les résultats obtenus suggèrent un effet très probable de la ration sur les propriétés physiques et fonctionnelles des neutrophiles. Avant de détailler ces effets, nous allons en premier lieu établir une analyse critique de la réalisation de nos essais.

### **3.1. Points forts et limites de l'étude**

#### **3.1.1. Animaux utilisés dans l'étude**

L'exploitation de nos résultats repose sur des analyses statistiques utilisant des modèles linéaires à effet fixe. La première limite de notre étude est le faible nombre de bovins utilisés pour cette étude. Les résultats obtenus mettent en évidence un effet individuel récurrent et marqué. L'effet Animal provoque quelques fois de plus grandes variations que les variations observées en relation avec la ration ou l'un des paramètres biochimiques (par

exemple l'effet Animal est quantitativement plus grand que celui de la ration sur la numération des GNN circulants, alors que les deux effets sont significatifs, cf. figure 24). Toutefois il était techniquement difficile d'augmenter l'effectif animal : l'évaluation d'un plus grand nombre d'animaux signifierait des coûts supplémentaires (fourniture des animaux et des matières premières pour la préparation de la ration, coût des analyses, ...), un recours à de la main d'œuvre ou une période expérimentale de plus longue durée et la nécessité de répéter plusieurs fois les essais. En effet, une personne seule peut difficilement gérer plus de quatre animaux à la fois pour ce genre de manipulations (alimentation, prélèvements, échantillonnages...). Le nombre de bovins utilisés pour notre étude a justement été adapté à ces contraintes.

Toutefois, pour compenser le faible nombre d'animaux analysés, nous avons utilisé un modèle dit en carré latin. Il s'agit d'un système de rotation dans le temps où les animaux reçoivent les deux types de ration à tout de rôle sur deux sessions différentes, ce qui permet de limiter l'effet Animal dans la variation des résultats. L'inconvénient de cette méthode est cependant l'ajout d'un biais supplémentaire lié au temps, puisque 2 sessions successives à des intervalles de temps plus ou moins longs sont nécessaires.

L'analyse statistique utilise une analyse de variance (ANOVA) adaptée à de faibles effectifs. Les différents modèles statistiques utilisés permettent de distinguer les effets interférents tels que l'effet de la session, et celui de la variabilité inter-individuelle (effet Animal), et des interactions entre les paramètres étudiés pour l'identification des effets instantanés. Le programme statistique calcule donc un effet Animal et un effet Session pour chaque paramètre testé (voir infra, § 3.1.4.).

Les troubles auxquels nous avons fait référence en introduction concernent essentiellement les vaches laitières en production. Nous pouvons donc légitimement nous interroger sur la représentativité et la pertinence de la catégorie de bovins que nous avons utilisés ; ce sont des mâles castrés, âgés de 28 mois. Le choix de ce type d'animal permet cependant de nous affranchir des variations liées au cycle sexuel chez la femelle, et donc aux variations hormonales, et de l'effet du stade physiologique comme la gestation et/ou la lactation. Par ailleurs, la probabilité d'apparition d'affections d'origine infectieuse est très réduite chez de jeunes mâles castrés à l'entretien, logés à l'attache dans des boxes individuels isolés d'autre contact animal et de la relative faible durée de l'étude (2 mois). Il faut cependant admettre que le métabolisme des bœufs à l'entretien est probablement assez différent de celui de la vache laitière en début de lactation, en particulier le volume

d'ingestion et le métabolisme hépatique. Ces différences peuvent gêner l'extrapolation des observations à la catégorie des vaches laitières en lactation.

### **3.1.2. Le prélèvement des échantillons**

Comme cela a été développé dans la partie bibliographique (§ 1.1.2.3), tout événement stressant engendre une neutrophilie dite de stress en lien avec une modification de l'adhésion des GNN à l'endothélium vasculaire. La répétition des prélèvements (contention des animaux à l'aide d'un licol à chaque date de prélèvement pour la réalisation de la ponction veineuse) pouvait générer un stress à l'origine d'une modification de la numération et des propriétés des neutrophiles. Cependant les animaux que nous avons utilisés ont été élevés et habitués au contact avec l'homme ; utilisés dans plusieurs essais, ils avaient l'habitude d'être manipulés. Ainsi les prélèvements se sont réalisés rapidement et dans le calme, et étaient donc sans conséquence sur les échantillons réalisés.

Les échantillons pour les analyses des fonctions immunitaires, réalisés à 9h chaque jour de prélèvement, ont été traités immédiatement après le prélèvement étant donné la proximité du laboratoire avec le site expérimental ; c'est un élément capital pour la réalisation de ce type d'étude étant donné la très grande réactivité des neutrophiles sanguins et la difficile conservation des échantillons en vue d'analyses *ex vivo* sur cellules vivantes.

### **3.1.3. Les analyses de laboratoire**

La purification des cellules est importante pour l'obtention de résultats pertinents, aussi bien du point de vue qualitatif que quantitatif.

Tout d'abord, il est primordial que les cellules (neutrophiles) sur lesquels les tests fonctionnels sont réalisés soient de la plus grande pureté possible.

Par ailleurs, la méthode de purification ne doit pas interférer avec les capacités de réponse ou l'état d'activation des neutrophiles. En effet, les neutrophiles, en tant que cellules très réactives, peuvent être activés lors de l'étape de purification, modifiant alors la capacité de réponse et l'expression des antigènes de surface (*Watson 1992, Macey 1992*). Le chimiotactisme, et en conséquence la capacité à la diapédèse, peuvent aussi être inhibés par la procédure de purification (*Glasser 1990*).

Le protocole de purification utilisé 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.

Tous ces paramètres (pureté, viabilité, ainsi que l'expression du récepteur CD11b) ont été rigoureusement contrôlés avant la validation des tests immunologiques. Ne connaissant pas l'impact d'une ration riche en azote sur les paramètres morphologiques (base de l'identification par cytométrie en flux) et fonctionnels des neutrophiles, il était important de vérifier que d'autres étapes du protocole de l'étude n'étaient pas susceptibles de les créer.

Les tests sont réalisés *ex vivo* sur des neutrophiles du sang préalablement purifiés. Or les conditions de conservation des neutrophiles, même de courte durée, sont différentes du milieu dans lequel ils se trouvent dans l'organisme (température, produits du métabolisme, autres cellules immunitaires et non immunitaires, pH, circulation, ...). La question de la transposition des effets *in vivo*, à l'échelle d'un tissu ou de l'organisme tout entier, et de la répercussion des modifications observées sur la capacité immunitaire se pose.

Le modèle expérimental possède aussi d'autres limites, liées au grand nombre de facteurs susceptibles de modifier le résultat des tests depuis l'animal jusqu'à la réalisation du test lui-même (variabilité des conditions de prélèvement, de conservation et de manipulation des cellules jusqu'au test, du temps écoulé entre le prélèvement et le test, ...). Ces variations expliquent probablement l'effet Session qui a été observé, et qui est présent malgré la réalisation des protocoles dans des conditions très standardisées.

Dans l'organisme, les cellules sanguines sont exposées à des molécules issues du métabolisme dont le nombre et le type varient au cours du temps. Le modèle statistique permet de rechercher des corrélations entre les fonctions neutrophiliques et le type de ration d'une part, entre les fonctions neutrophiliques et les paramètres biochimiques mesurés d'autre part, mais aussi entre le type de ration et les paramètres mesurés. Lorsqu'une variation d'une activité neutrophilique est détectée en relation avec un paramètre, il est nécessaire de déterminer l'origine de la variation de ce paramètre. Elle peut bien entendu être la conséquence du type de ration ingérée, mais aussi l'effet d'autres facteurs qui font varier la concentration du dit paramètre en fonction du temps (conditions d'ambiance, etc). L'analyse statistique ne permet pas toujours de trancher. Un paramètre peut varier en fonction de la ration ingérée, sans que cela ne soit mis en évidence par l'étude statistique (notion de

significativité statistique). Ainsi, l'interprétation de ces corrélations et l'identification des facteurs causaux n'est pas toujours aisée.

D'autre part, les neutrophiles sont prélevés à partir du sang. Or ces cellules n'exercent leurs fonctions bactéricides qu'une fois qu'elles ont traversé la paroi vasculaire, après interaction avec les cellules endothéliales, et qu'elles se trouvent dans les tissus. Les différentes étapes qui vont permettre *in fine* l'élimination de l'agent infectieux sont nombreuses : adhésion à l'endothélium, réponse aux signaux chimiotactiques, diapédèse, phagocytose ... Ainsi dans les conditions naturelles, ces étapes se succèdent et interagissent entre elles, alors qu'*in vitro* les fonctions sont évaluées séparément, ce qui n'est a priori pas représentatif de la situation réelle.

En outre, il est difficile d'affirmer que les capacités fonctionnelles des neutrophiles destinées à éliminer un agent pathogène soient les mêmes entre les neutrophiles sanguins (matures mais non activés) et les neutrophiles localisés dans les tissus (activés par les signaux chimiotactiques). Les données de la littérature sont contradictoires sur ce point : certaines montrent qu'il existe une bonne corrélation, d'autres peu, voire aucune. Par exemple, d'après *Dulin (1988)*, la CL naturelle des neutrophiles du lait est supérieure à celle des neutrophiles sanguins non activés. Ceci est attribué à la dégranulation provoquée par l'ingestion des globules gras et des micelles de caséine par les neutrophiles du lait. Par contre, après stimulation avec le PMA, la capacité des neutrophiles du lait à produire des formes réactives de l'oxygène est diminuée par rapport à celle des neutrophiles sanguins (*Mehrzaad 2001*). Le contact avec les composants du lait a rendu les GNN du lait moins sensibles à l'activation.

Cependant, la migration des neutrophiles semble aussi être à l'origine d'une modification de leur activité. *Smits (1999)* a montré que la diapédèse des neutrophiles *in vitro* provoque une diminution de la phagocytose et de l'explosion respiratoire. De même, l'adhérence des GNN aux molécules de la matrice extra-cellulaire diminue la production de FRO suite à l'exposition à des médiateurs de l'inflammation (*Borgquist 2002*). D'autre part, la diapédèse peut également 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 telles que le TNF $\alpha$ , les interférons, et des interleukines (IL-1 $\alpha$ ). Il a été montré que ces cytokines sont à l'origine d'une augmentation de l'adhésion, de la phagocytose et de la bactéricidie (*Smits 1998*).



### 3.1.4. Les limites de l'interprétation de l'analyse statistique

Le programme statistique permet de calculer un effet Animal et un effet Session pour chaque paramètre testé. Une corrélation significative entre deux paramètres (par exemple effet significatif d'un paramètre biochimique sur une fonction neutrophilique) peut être accompagnée d'un effet Animal et/ou Session, ce qui est souvent le cas dans notre étude. Dans ces cas-là il est important de comparer d'un point de vue quantitatif l'interaction significative entre 2 paramètres avec l'effet Animal et/ou Session associé(s) : en effet un résultat significatif n'est pas forcément marqué du point de vue de la variation. Par exemple, l'analyse statistique selon le modèle [Numération = 1 + Animal + Session + Ration] montre un effet significatif de la ration sur le nombre de GNN (cf. figure 24). On note également un effet Animal marqué : l'animal C présente en moyenne  $1.10^9$  neutrophiles.l-1 de plus que A ou B, quand l'effet Ration ne génère une différence moyenne que de  $0,4.10^9$  cellules.l-1 de sang entre la ration à 14 % et celle à 20 % de MAT. L'effet Ration est nettement inférieur à l'effet Animal : il est difficile de conclure sur le résultat biologique final associé à une ration dont la teneur en MAT est plus élevée.

Les effets Animal et Session, bien que marqués, sont estompés à cause de la méthode du carré latin. Les résultats sont parfois ambigus, comme le montre l'exemple de l'effet instantané de  $\text{NH}_3$  sur la production des FRO de la part des GNN activés avec le PMA à  $0,01 \mu\text{M}$ . Sur la figure 38, l'animal C présente un effet au sens inversé par rapport aux trois autres animaux. Cet effet individuel est masqué par l'effet moyen des 4 animaux, mais il diminue fortement le poids statistique du résultat final, et cela est directement attribuable au faible effectif utilisé.

Par ailleurs, l'utilisation de la méthode du carré latin requiert 2 sessions successives : les deux rations différentes sont appliquées consécutivement aux mêmes animaux. On peut craindre que les résultats expérimentaux soient affectés par l'existence d'éventuels effets résiduels d'interactions entre objets, ce qui peut fausser les données statistiques, et expliquer en partie la récurrence de l'effet Session.

### **3.1.5. Mesure de la fonction oxydative des GNN**

Il existe un certain nombre de tests permettant d'étudier les fonctions de dégranulation des GNN (*Dahlgren 2007*), et plusieurs de ces tests ont été récemment adaptés et validés pour l'espèce bovine (*Rinaldi 2007*). Entre les mesures par photométrie, par précipitation, par fluorométrie ou par cytométrie en flux, nous avons choisi une technique utilisant la luminométrie. Plusieurs substrats émetteurs de photons sont utilisables. Nous avons choisi le luminol car il s'agit d'un substrat permettant de détecter les productions des FRO intra et extracellulaires, et surtout car il est très sensible et qu'il est facile de suivre l'émission de lumière dans une analyse en cinétique.

## **3.2. Discussion des effets**

### **3.2.1. Effet de la proportion de matière azotée totale : effet Ration**

Selon la ration ingérée par les animaux, le nombre de neutrophiles circulants est significativement différent ( $p < 0,01$ ). En effet, le nombre de neutrophiles est inférieur (variation de 10%) avec la ration contenant 20 % de MAT par rapport à celle à 14 %. La ration a également un effet significatif sur l'expression des L-sélectines (CD62L) à la surface des neutrophiles ( $p < 0,05$ ) : la ration à 20 % de MAT est associée à une plus grande expression des L-sélectines par rapport à la ration à 14 %.

Selon *De Marchi (2010)* et *Millet (2010)*, un excès chronique d'azote soluble dans la ration (jusqu'à 24 % de MAT) pendant 1 mois provoque une augmentation de l'expression de CD62L, mais il n'est pas corrélé à une variation de la numération des GNN. Il est donc possible qu'après un certain temps, une régulation de la numération de neutrophiles s'établisse provoquant un retour aux valeurs de numération initiales ; ainsi l'effet de l'azote sur la numération s'amenuise, voire disparaît.

### 3.2.2. Numération cellulaire et expression de CD62L

Nous avons montré que la teneur en MAT de la ration est corrélée positivement et de façon significative à l'ammoniémie, à l'urémie et à la kaliémie : tous les trois augmentent avec la teneur en azote soluble de la ration. Or on observe des effets significatifs comparables (sens de la variation et pente) sur le nombre de GNN et l'expression de CD62L avec ces paramètres qu'avec la teneur en azote de la ration. Bien que l'effet direct de la ration soit statistiquement établi, il est cependant difficile de déterminer une relation de causalité pour les différents paramètres sanguins. De plus, les variations d'urémie, de l'ammoniémie et de la kaliémie sont statistiquement corrélées entre elles. L'étude statistique ne permet pas de déterminer avec certitude lequel de ces paramètres biochimiques est prépondérant, ni si un seul est suffisant pour provoquer les effets observés.

Dans le sang, on distingue deux catégories de neutrophiles circulants, selon qu'ils sont libres ou marginalisés (cf. partie I § 1.1.1.). Une augmentation de l'expression de CD62L à la surface des GNN augmente leur pouvoir d'adhésion à l'endothélium vasculaire ; il est possible qu'un plus grand nombre de GNN soit marginalisé, induisant par conséquent une neutropénie relative.

Cette hypothèse est confortée par un autre constat : tous les paramètres biochimiques associés à une augmentation du nombre de neutrophiles circulants ont un effet négatif sur l'expression de la L-sélectine, comme par exemple le glucose, le BOHB et le cuivre. Les deux phénomènes évoluent donc de façon antiparallèle : chaque fois qu'un paramètre a un effet significatif sur le nombre de neutrophiles circulants, il présente un effet opposé sur l'expression de CD62L à la surface des neutrophiles. La liaison étroite entre numération et expression de CD62-L est illustrée par le fait qu'aucun des paramètres biochimiques n'a qu'un seul de ces deux effets.

Il semblerait donc que l'excès d'azote aigu favorise l'adhésion des neutrophiles à la paroi vasculaire (étape du « rolling »), première étape de la diapédèse. Ainsi les neutrophiles pourraient mieux recevoir les signaux chimiotactiques initiant la migration dans les tissus. Cela dit l'effet observé reste modeste, et inférieur aux différences mesurées entre les animaux.

L'effet de l'urémie, de l'ammoniémie et/ou de la kaliémie sur le nombre de leucocytes circulants ainsi que sur l'expression des L-sélectines, bien que statistiquement significatif,

reste modéré, et les répercussions biologiques qui en découlent doivent être déterminées. D'autre part, des données de la littérature sont en contradiction avec ce constat. Par exemple, *Zarbock (2006)*, a montré que chez la souris, l'expression de CD62L est diminuée à la surface des neutrophiles prélevés chez des souris hyper-urémiques (urémie provoquée par néphrectomie bilatérale ou par ischémie rénale) par rapport aux neutrophiles issus de souris saines. Cette réaction opposée peut être due au modèle expérimental, ou à la différence de comportement de neutrophiles d'espèces distinctes.

**Le potassium** est le principal cation du milieu intracellulaire. Il est indispensable à de nombreux processus biologiques en particulier à l'établissement des potentiels membranaires, et donc à l'excitabilité des cellules.

Dans le sang, le potassium est libre sous la forme ionique  $K^+$ . La concentration de potassium dans le plasma est faible (3,5 – 4,5 mmol.l<sup>-1</sup>) et est étroitement régulée.

Au cours de l'essai, les écarts des valeurs de la kaliémie entre animaux et entre mois étaient faibles. Cependant, plus la kaliémie est élevée, plus la production de FRO est grande pour les neutrophiles activés avec le PMA à la concentration de 1  $\mu$ M. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par *Millet (2010)*.

Statistiquement, les variations de la kaliémie sont corrélées au taux de MAT, mais cet effet est moins important que l'effet Animal. Les végétaux verts et les fourrages (la luzerne déshydratée par exemple) sont des sources abondantes de potassium. En raison de la grande quantité de salive sécrétée par les ruminants, une partie de l'apport est lié au recyclage du potassium prélevé par les glandes salivaires dans le plasma. Le potassium est absorbé par simple diffusion à travers l'intestin ; l'efficacité de cette absorption est très grande (95% du potassium alimentaire est absorbé). D'après l'analyse des aliments utilisés, les apports en potassium sont supérieurs de 26 g pour la ration à 14% par rapport à la ration à 20 % de MAT (soit une différence de 7% des apports totaux), alors que la kaliémie est inférieure chez les animaux recevant la ration à 14% de MAT. Cet effet Ration pourrait provenir de l'apport en sodium, qui est de 140 mg par jour plus élevé dans la ration à 14% de MAT par rapport à celle à 20% de MAT. En effet, l'élimination urinaire du sodium dans les urines mobilise entre autres des co-transporteurs Na/K, ce qui peut être associée à une augmentation de la réabsorption sanguine de potassium. Le rôle direct de la teneur en azote, ou de la présence de l'urée, sur la kaliémie est peu probable.

### 3.2.3. Expression du récepteur CD11b

Les paramètres biochimiques qui interagissent avec la teneur en MAT de la ration ne possèdent pas d'effet sur l'expression des intégrines. Seul un effet instantané est suggéré sans qu'il soit possible d'en dégager un effet global significatif.

*Fernandez (2002)* a montré que chez des enfants atteints de syndrome urémique hémolytique, l'expression de CD11b et CD16 est diminuée par rapport aux enfants sains. Cependant ces résultats ont été obtenus à partir de neutrophiles exposés à de très grandes concentrations d'urée (urémie jusqu'à 46 mmol.l<sup>-1</sup>); durant notre étude les plus hautes valeurs d'urémie n'ont jamais dépassé 10 mmol.l<sup>-1</sup>. Cela suggère qu'à la différence de CD62L, une variation de l'expression de CD11b n'est observée qu'en présence de fortes concentrations d'urée sanguine, valeurs qui ne sont probablement pas atteintes, étant donné la teneur en azote des rations distribuées dans les élevages.

L'analyse statistique des paramètres biochimiques ponctuels met en évidence le rôle possible de certains éléments sur l'expression de CD11b : le sélénium et le cuivre l'augmentent, alors que le BOHB la diminue.

La concentration plasmatique du sélénium est basse et dépend très fortement des apports instantanés. La mesure de l'activité de la glutathion-peroxydase érythrocytaire reflète au contraire les apports en sélénium au cours des dernières semaines, au moment de l'hématopoïèse.

Le cuivre est un métal de transition qui est le cofacteur de nombreuses enzymes. L'organisme ne contient que très peu de cuivre, qui est distribué très inégalement selon les organes : sa concentration est maximale dans le foie où il est dix fois plus concentré que dans le sang. Dans le plasma, la concentration de cuivre est faible (13-19 µmol.l<sup>-1</sup>) et le cuivre n'y est pas libre : 60 à 90% du cuivre est lié à la céruloplasmine et la quantité restante est transportée par l'albumine. Au cours de l'essai, la valeur de la cuprémie varie entre 11,1 et 16,8 µmol.l<sup>-1</sup>.

Les résultats obtenus dans notre étude montrent que les capacités d'adhésion et de transmigration via les intégrines sont meilleures lorsque les valeurs de la séléniémie ou de la cuprémie augmentent, ou lorsque le BOHB est faible. En ce qui concerne le sélénium, ce constat est compatible avec les observations d'*Aziz et al. (1984)* qui ont montré que chez la chèvre la migration des neutrophiles dans un test *in vitro* était réduite lors de carence en sélénium. Le rôle du sélénium sur les fonctions immunitaires des bovins, notamment neutrophiliques, n'est aujourd'hui plus à démontrer (*Spears 2000, Arthur 2003*). Le cuivre est

un oligo-élément qui fait souvent défaut dans l'apport alimentaire, compte tenu de sa faible teneur dans les fourrages. Les effets considérés soutiennent les conseils nutritionnels qui visent à compléter la ration des vaches en cuivre.

Cependant, les variations observées ici sont difficiles à relier à un effet biologique. Par exemple, il est impossible d'établir un lien entre les petites variations de BOHB observées et un déséquilibre énergétique, mais plutôt à une variabilité individuelle de ces valeurs.

Ainsi, plusieurs paramètres biochimiques interviennent dans l'expression des récepteurs membranaires CD62L et CD11b à la surface des GNN, dans le sens d'une augmentation ou d'une diminution. Seuls le cuivre et le BOHB génèrent des variations sur les deux types de marqueurs. Le cuivre a un effet positif sur CD62L mais négatif sur CD11b, tandis qu'une diminution du BOHB est associée à une meilleure expression des deux types de récepteurs.

Les L-sélectines et les intégrines (CD11b) jouent un rôle dans l'adhésion endothéliale, étape préalable de la diapédèse ; les intégrines favorisent aussi la phagocytose (adhésion aux opsonines du complément) et interviennent dans la régulation de la réponse immunitaire. Par conséquent, certains paramètres semblent favoriser l'activation des neutrophiles (teneur en MAT de la ration, urée, ammoniac, potassium, BOHB, GSH-Px), d'autres l'altèrent (glucose) ; le cuivre a un effet contrasté.

#### **3.2.4. Production des formes réactives de l'oxygène en fonction du mode d'activation des neutrophiles**

Les effets sont ceux liés à la mesure de l'activité oxydative, elle-même corrélée à la chimioluminescence.

##### ***3.2.4.1. Production basale***

La production basale des FRO par les neutrophiles est mesurée en l'absence de stimulation, c'est-à-dire à partir des neutrophiles incubés avec le luminol sans agent activateur.

La corrélation négative et significative de la MAT de la ration et du pH sur la production basale des FRO suggère que les GNN perdent une partie de leur potentiel oxydatif, lorsque l'apport en azote ou lorsque le pH sanguin augmentent.

Bien que l'analyse statistique n'ait pas mis en évidence d'interaction significative entre la teneur en MAT de la ration et le pH sanguin, il a été montré au cours d'une étude préliminaire qu'une intoxication aiguë avec du tourteau de soja provoque une alcalose métabolique (*Ferrières 2009*). Il est donc possible que les deux effets soient directement liés, et ne correspondent en fait qu'à un seul et même effet. Ceci illustre à nouveau la difficulté à séparer les paramètres causaux des effets corrélés. Il est possible que le pH agisse directement sur l'activité des neutrophiles. Cependant il est aussi le résultat de l'alcalose métabolique lors d'intoxication par l'azote soluble ; il est donc difficile d'affirmer que l'effet est directement dû au pH ou via d'autres molécules présentes dans les mêmes conditions (urée, ammoniac...).

#### ***3.2.4.2. Après activation***

Les nombreuses valeurs négatives de CL associées à la condition avec l'OZP à la concentration de 25 µg.ml<sup>-1</sup> (après soustraction de la CL de base et du bruit de fond) montrent qu'à cette concentration, l'activation des neutrophiles était insuffisante pour induire une production de FRO significativement différente de la production basale.

Aucun effet de la MAT ni des métabolites de l'azote (urée, NH<sub>3</sub>) n'est observé sur les fonctions oxydatives des neutrophiles activés.

Une augmentation du **pH**, bien que les variations restent faibles, est à l'origine d'une stimulation de la production des FRO de la part des cellules activées avec l'OZP aux concentrations de 80 et 250 µg.ml<sup>-1</sup>.

Une augmentation de la glycémie est statistiquement corrélée à une diminution de la fonction oxydative sur les GNN activés au PMA à la concentration de 0,01µM.

Plusieurs paramètres biochimiques mesurés ponctuellement présentent des effets significatifs sur la CL des cellules activées avec le PMA : le BOHB, la GSH-Px, le zinc, l'iode, la T4 et les AGNE. On retrouve parfois ces effets aux concentrations de 0,01 et 0,1 µM, à l'image du zinc et du GSH-Px.

Aucun effet significatif n'est observé à la concentration de 1  $\mu$ M.

L'étude des effets instantanés suggère une possible action de l'ammoniac aux plus hautes concentrations sur la production des FRO des GNN activés avec le PMA à 0,01  $\mu$ M. Cette corrélation négative est significative mais n'est pas uniforme parmi les quatre animaux. Un plus grand effectif serait nécessaire pour établir une conclusion robuste.

L'activation des cellules par l'OZP dépend de l'engagement de récepteurs cellulaires tels que les récepteurs TLR-2 et Dectin-1, alors que la PMA diffuse à travers la membrane plasmique et agit directement sur la PKC.

La modification liée au pH toucherait donc une voie d'activation indépendante de la voie de la PKC. Or l'activation cellulaire via les récepteurs cellulaires, notamment les TLR, met en jeu plusieurs voies de transduction (figure 7), dont certaines ne sont pas encore complètement connues.

Les modifications liées aux variations de la glycémie, des concentrations en BOHB, en GSH-Px, en AGNE, en iode, en T4 et en zinc proviendraient d'un effet plus en aval, au niveau de la cascade intracellulaire de signalisation.

Dans notre essai, l'augmentation de l'activité de la GSH-Px est corrélée à une augmentation de l'activité de CL des cellules activées avec le PMA à 0,1 et 0,01  $\mu$ M, résultat compatible avec une meilleure réponse immunitaire chez les individus présentant une plus haute séléniémie.

Les métabolites retrouvés dans le sang en cas de déficit énergétique, à l'image du BOHB et des AGNE, sont liés à une diminution de la production cellulaire de FRO. Le BOHB est parmi les trois corps cétoniques (avec l'acétone et l'acéto-acétate) celui dont la concentration est la plus élevée dans le sang. Synthétisés majoritairement par le foie, les quantités de corps cétoniques augmentent en cas de déficit énergétique. Bien qu'au cours de notre essai les apports énergétiques sont suffisants, ceci pourrait illustrer la tendance des animaux ayant un déficit énergétique à moins bien se défendre contre des infections ; par exemple, *Duffield (2000)* a montré que la cétose subclinique serait un facteur augmentant le risque de métrite chez la vache laitière. Plus précisément, les capacités de phagocytose et de bactéricidie des neutrophiles sont altérées en présence de corps cétoniques (*Suriyasathaporn 2000*).

Dans l'organisme, il existe une homéostasie des hormones thyroïdiennes T4 et T3 : T4 devient T3 en libérant de l'**Iode**. Les apports en iode étant constants dans notre étude, les



concentrations en iode et en T4 sont inversement corrélées. Ceci rend plus robuste les effets mis en évidence par l'analyse statistique : l'iode augmente la production de FRO des cellules activées au PMA à 0,1  $\mu\text{M}$ , alors que l'hormone thyroïdienne la diminue. *Kanazawa (1992)* a aussi montré que des taux élevés d'hormone T4 ont des effets négatifs sur les fonctions neutrophiliques. En effet, la production de radicaux libres (notamment de peroxyde d'hydrogène) est exacerbée lorsque les neutrophiles (de même que les macrophages) sont incubés en présence d'hormone thyroïdienne, ceci semblant être à l'origine de pathologies (comme l'asthme) chez les patients atteints d'hyperthyroïdisme.

L'augmentation de la **zincémie** est liée à une importante augmentation des fonctions oxydatives des neutrophiles activés avec le PMA aux concentrations de 0,1 et 0,01  $\mu\text{M}$ . Les données de la littérature sur les effets du zinc et les capacités immunitaires sont contradictoires. Cependant, une étude récente destinée à clarifier le rôle du zinc est compatible avec nos observations puisqu'elle a montré le rôle de cet oligo-élément dans la stimulation des fonctions oxydatives des GNN (*Freitas 2010*). Des mécanismes sont proposés. A de faibles concentrations (5 à 12,5  $\mu\text{M}$ ), il active la NOX, essentiellement via la PKC, et conduit à la formation de l'ion superoxyde. De plus grandes concentrations accélèrent la dismutation du radical superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène, qui sera utilisé par la MPO pour synthétiser de l'acide hypochlorique.

### 3.2.5. Le pouvoir bactéricide

Peu de paramètres ont un effet significatif sur le pouvoir bactéricide des neutrophiles, probablement à cause d'un écart-type relativement grand. Seuls le pH, la chlorémie et le glucose ont présentent un effet.

Un **pH** alcalin est associé à une meilleure bactéricidie. Comme nous l'avons vu précédemment, les effets des variations de pH, mêmes infimes, peuvent être reliés à la MAT de la ration, sans que cela soit possible de le confirmer ou de l'exclure.

L'augmentation de la **glycémie** est associée à une diminution du pouvoir bactéricide des neutrophiles. Cette altération de la bactéricidie est probablement en lien avec l'altération de la capacité d'oxydation des GNN activés avec le PMA (cf. supra). Aux concentrations d'azote soluble mesurées dans notre étude, aucune relation entre la glycémie et les autres paramètres biochimiques, et aucun effet de la ration sur la glycémie n'ont été mis en évidence. 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  $\beta$  du pancréas (Vissek 1984). Des études ont cherché à évaluer l'impact de l'hyperglycémie ou de l'hyperinsulinémie sur les fonctions neutrophiliques chez des patients diabétiques, sans parvenir à mettre en évidence d'effets significatifs de la glycémie ou de l'insulinémie sur les fonctions des GNN (Fejfarová 2006). Kjersem (1988) a cependant démontré que les capacités de phagocytose des neutrophiles étaient diminuées après une brève hyperglycémie compatible avec celle qu'on retrouve chez des patients souffrant de diabète.

Nous avons constaté que l'augmentation de la **chlorémie** est associée à une baisse de la bactéricidie.

### 3.2.6. Synthèse des effets

L'effet de la MAT de la ration le plus évident et le plus significatif que nous ayons mis en évidence est l'augmentation de l'expression de CD62L, associée à une diminution de la numération sanguine des GNN. Les paramètres biochimiques ayant une interaction significative avec la teneur en MAT (ammoniac, urée, potassium, mais pas le pH) présentent les mêmes effets. Face à cela, il demeure difficile de hiérarchiser les effets observés en fonction des différents paramètres.

Parmi tous les paramètres en interaction avec l'apport en azote de la ration, seul le pH présente des effets sur les fonctions neutrophiliques. Son augmentation, de même que des apports élevés en azote soluble, sont en relation avec une meilleure conservation du potentiel oxydatif des GNN.

Notre protocole expérimental, dont le but est de mesurer les effets d'une augmentation des apports en MAT dans la ration ingérée selon un modèle aigu, a une durée de 10 jours pour chaque session. Les modèles utilisés pour l'analyse statistique ne tiennent pas compte de l'effet Temps. Il est légitime de se demander si, après quelques jours, l'organisme ne s'adapte pas à l'augmentation des apports azotés (modifications de la population des micro-organismes du rumen et de la flore intestinale, habitude des cellules sanguines à la composition biochimique environnante...). C'est pourquoi nous avons effectué en parallèle des analyses

statistiques en ne considérant que les derniers jours pour rechercher des interactions significatives. La comparaison de ces effets avec ceux de la session a révélé des corrélations qualitativement similaires entre les deux types d'effets, bien que ceux-ci ne soient pas systématiquement significatifs.

Les conclusions de notre essai suggèrent que l'excès d'azote soluble de la ration de façon aiguë peut conduire à un recrutement augmenté des neutrophiles dans les tissus : une meilleure expression membranaire des récepteurs d'adhésion (L-sélectines) permettant une meilleure détection des signaux chimiotactiques, et la conservation du potentiel oxydatif. Ceci est différent des effets mis en évidence précédemment par les études de *Millet 2010* et *De Marchi 2010* qui ont montré que l'ammoniac et l'urée ont des effets négatifs à moyen terme (effets chroniques) sur les fonctions oxydatives après activation à l'OZP.

Toutefois, les effets mesurés sont modérés, et le seul test évaluant au final les fonctions bactéricides n'a pas permis d'identifier d'effet significatif pour tous ces paramètres en lien avec la ration.

Cependant, sans avoir observé de rôle de la ration sur la glycémie comme le suggère *Ferrières (2009)*, l'essai montre un effet délétère évident du glucose sur les neutrophiliques : une augmentation de sa concentration sanguine est en relation avec une diminution de l'expression des L-sélectines, une diminution du pouvoir oxydatif via la PKC, et une altération de la bactéricidie.

D'autre part, cette étude suggère le rôle prépondérant des oligo-éléments et des ions sur les capacités de défense immunitaire. Sans pouvoir les relier à un effet de la ration, ni expliquer les mécanismes mis en jeu, un grand nombre de ces paramètres ont des effets significatifs sur les fonctions neutrophiliques.

### 3.3. Perspectives

L'étude d'autres aspects de la réponse neutrophilique aurait été utile pour préciser les différences observées ; notamment l'évaluation de la diapédèse et de la phagocytose aurait permis de détecter des altérations de ces mécanismes.

Les effets mis en évidence au cours de notre essai, bien que parfois fortement significatifs, restent faibles à modérés. Ils sont bien souvent inférieurs ou similaires aux écarts que l'on retrouve entre deux animaux. Par conséquent, il est difficile de relier ces effets significatifs d'un point de vue statistique à une répercussion biologique ou fonctionnelle. Nous aurions probablement obtenus des résultats quantitativement plus importants avec des rations dont la teneur en azote était plus élevée. Mais le principe de ce mémoire est de modéliser les apports que l'on retrouve en pratique dans les élevages, en particulier à des moments critiques de changement brutal du rationnement. D'après *Head (1957)*, après 8 jours de pâturage, l'ammoniémie des vaches passe d'une valeur moyenne de 33.2  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  à 88.6  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Au cours de notre essai, les valeurs d'ammoniémie évoluent d'environ 30  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  avec la ration de base à 80  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  au pic de la cinétique journalière avec la ration à 20% de MAT. L'augmentation de l'apport azoté que nous avons provoqué dans cet essai correspond assez bien à une situation réelle en élevage, comme par exemple celle de la transition alimentaire d'une ration en stabulation vers la consommation d'herbe à un stade végétatif précoce au printemps ; les effets sur l'augmentation de l'ammoniémie sont du même niveau.

# Conclusion

Les résultats obtenus ne permettent pas de conclure de façon certaine à propos d'une modification des capacités de défense immunitaire en présence d'apports azotés au-delà des recommandations.

Nous avons montré qu'une augmentation de la quantité d'azote de la ration augmente vraisemblablement l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium des vaisseaux sanguins. Ce constat suggère qu'une augmentation du recrutement tissulaire des neutrophiles est possible. Toutefois, à l'image des pathologies infectieuses pulmonaires ou mammaires, la qualité de la guérison bactériologique et fonctionnelle dépend fortement de la régulation de la réponse immunitaire. Un afflux trop grand de neutrophiles sur le site inflammatoire est aussi la source de dégâts tissulaires. Il est possible que l'excès d'azote rende les GNN plus enclins à traverser l'endothélium vasculaire, et soit donc en faveur d'un afflux moins bien régulé des GNN sur le site inflammatoire, avec pour conséquence les effets délétères et un accroissement de l'inflammation. Ce phénomène peut être associé à une augmentation de l'incidence des affections inflammatoires à certaines périodes critiques.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

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

Je soussigné, **Gilles FOUCRAS**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Samuel GANNAC** intitulée « *Impact de l'excès aigu d'azote soluble dans la ration des bovins sur les fonctions des neutrophiles sanguins* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

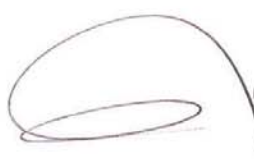
Fait à Toulouse, le 21 Novembre 2011  
Professeur Gilles FOUCRAS  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
Le Directeur de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Professeur Alain PHILON



Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Bruno MARCHOU



Professeur Bruno MARCHOU  
Médicins Inférioristes et Impérialistes  
CIR de Toulouse - Hôpital PURPAN  
31059 TOULOUSE Cedex 9

Vu et autorisation de l'impression :  
Le Président de l'Université  
Paul Sabatier 23 NOV. 2011  
Professeur Gilles FOURTANIER



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

## Références bibliographiques

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

**Akira S., Takeda K.** (2004) : Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* **4** (7) : 499 – 511.

**Alsemgeest S.P., Taverne M.A., Boosman R., Van Der Weyden B.C., Gruys E.** (1993) : Peripartum acute-phase protein serum amyloid-A concentration in plasma of cows and fetuses. *Am J Vet Res.*, **54** (1) : 164 – 7.

**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.

**Arnhold J., Flemmig J.** (2010) : Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity, *Arch Biochem Biophys.*, **500** (1) : 92 – 106.

**Arthur J.R, Mc Kenzie R.C., Beckett G.J.** (2003) : Selenium in the immune system. *J. Nutr.*, **133** : 1457 – 1459.

**Assari T.** (2006) : Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD. *Medical Immunology*, **5** : 4.

**Aziz E., Klesius P.H., Frandsen J.C.** (1984) : Effects of selenium on polymorphonuclear leukocyte function in goats. *Am. J. Vet. Res.*, **45** : 1715 – 1718.

**Babior B.M., Kipnes R.S., Curnutte J.T.** (1973) : Biological defense mechanisms : production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* **52** : 741 – 744.

**Babior, M.B.** (1999) : NADPH oxydase : an update, *Blood.*, **93**(5) : 1464 – 1476.

**Bainton D.F., Ulliyot J.L., Farquhar M.G.** (1971) ; The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow, *J. Exp. Med.*, **134** : 907 – 934.

**Borgquist J.D., Quinn M.T., Swain S.D.** (2002) : Adhesion to extracellular matrix proteins modulates bovine neutrophil responses to inflammatory mediators. *J. Leukoc. Biol.*, **71** : 764 – 774.

**Bourgès-Abella N.** (2008) : L'hématopoïèse, *cours de biologie médicale animale et comparée*, A2, ENVT.

**Bourgès-Abella N.** (2008) : Les analyseurs d'hématologie vétérinaire, *cours de biologie médicale animale et comparée*, A2, ENVT.

**Buret A.G.** (2010) : Immuno-modulation and anti-inflammatory benefits of antibiotics : The example of tilmicosin; *Can. Vet. Res.*, **74** (1) : 1 – 10.

**Burton J.L., Kehrli M.E. Jr., Kapil S., Horst R.L.** (1995) : Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophils by glucocorticoids : effects of cortisol and dexamethasone, *J. Leukoc. Biol.* **57** : 317 – 325.

**Burvenish C, Paape MJ, Hill AW, Guidry AJ, Miller RH, Heyneman R, Kremer WD, Brand A.** (1994) : Role of the neutrophil leucocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced E. coli mastitis in cows immediately after calving, *Vet. Q.* **16**: 45 – 50

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



**Capuco A.V., Paape M.J., Nickerson S.C.** (1986) : In vitro study of polymorphonuclear leukocyte damage to mammary tissues of lactating cows, *Am. J. Vet. Res.*, **47** : 663 – 668.

**Carlson G.P. & Kaneko J.J.** (1975) : Intravascular granulocyte kinetics in developing calves. *Am. J. Vet. Res.* **36**: 421 – 425.

**Cavaillon J.M.** (1996) : Cytokines et inflammation, *Les cytokines*, 2<sup>e</sup> édition. **32** : 509 – 514.

**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.

**Cohen G., Haag-Weber M., Hörl W.H.** (1997) : Immune dysfunction in uremia. *Kidney Int.*, **52** [Suppl 62] : S79 – S82.

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

**Coppi M., Niederman R.** (1989) : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165** : 377 – 383.

**Coxon A., Rieu P., Barkalow F.J., Askari S., Sharpe A.H., Von Andrian U.H., Arnaout M.A., Mayadas T.N.** (1996) : A novel for the beta 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis : a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity* **5** : 653 – 666.

**Cross A.R., Segal A.W.** (2004) : The NADPH oxidase of professional phagocytes - prototype of the NOX electron transport chain systems, *Biochim Biophys Acta.*, **1657** (1) : 1 – 22.

**Dale D.C., Boxer L., Liles W.C.** (2008) : The phagocytes : neutrophils and monocytes. *Blood*, **112** (4) : 935 – 945.

**Dahlgren C., Karlsson A., Bylund J.** (2007) : Mesurement of respiratory burst products generated by professional phagocytes. *In : M.T. Quinn, F.R. DeLeo & G.M. Bokoch Methods*

*in Molecular Biology, vol 412 : Neutrophil Methods and Protocols Humana Press Inc. Totowa, NJ, 349 – 363.*

**De Marchi L.** (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 :* 2010 ; 4009. 140pp.

**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.

**Dosogne H., Burvenich C., Paape M.J.** (1998) : Effect of extracellular ionic calcium and magnesium on opsonic and non-opsonic phagocytes of *Escherichia coli* bovine blood polymorphonuclear leucocytes, *Comp. Haematol. Int.*, **8** : 82 – 86.

**Duffield T.** (2000) : Subclinical ketosis in lactating dairy cattle, *Veterinary clinics of North America, Food animal practice*, **16** : 231 – 253.

**Dulin A.M., Paape M.J., Nickerson S.C.** (1988) : Comparison of phagocytosis and chemoluminescence by blood and mammary gland neutrophils from multiparous and nulliparous cows. *Am. J. Vet. Res.*, **49** : 172 – 177.

**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 F.** (2007) : L'alimentation azotée des ruminants, *cours d'alimentation*, A1, ENVT.

**Fejfarová V, Jirkovská A, Lupínková J, Kovár J, Kalanin J, Stríz I, Skibová J, Boucek P, Pelikánová T.** (2006) : Effect of acute hyperglycemia and/or hyperinsulinemia on polymorphonuclear functions in healthy subjects. *Metabolism*, **55** (6) : 811 – 8.

**Ferguson J.D., Chalupa W.** (1989) : Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows, *J. Dairy Sci.*, **72** (3) : 746 – 766.

**Fernandez J.M., Croom W.J. Jr., Johnson A.D., Jaquette R.D., Edens F.W.** (1988) : Subclinical ammonia toxicity in steers: effects on blood metabolite and regulatory hormone concentrations. *J Anim Sci.*, **66** (12) : 3259 – 66.

**Ferrante A.** (1985) : Inhibition of human neutrophil locomotion by the polyamine oxidase-polyamine system, *Immunology*, **54** : 785 – 790.

**Ferrières 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.

**Fiedler T.J., Davey C.A., Fenna R.E.** (2000) : X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8Å resolution, *J. Biol. Chem.*, **275** : 11964 – 71.

**Filias A, Theodorou GL., Mouzopoulou S, Varvarigou AA, Mantagos S, Karakantza M** (2011) : Phagocytic ability of neutrophils and monocytes in neonates. *BMC Pediatr.*, **11** : 29.

**Fischer C.D., Beatty J.K., Zvaigzne C.G., Morck D.W., Lucas M.J., Buret A.G.** (2011) : Anti-Inflammatory Benefits of Antibiotic-Induced Neutrophil Apoptosis: Tulathromycin

Induces Caspase-3-Dependent Neutrophil Programmed Cell Death and Inhibits NF- $\kappa$ B Signaling and CXCL8 Transcription. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **55** (1) : 338 – 348.

**Freitas M., Porto G., Lima J.L., Fernandes E.** (2010) : Zinc activates neutrophils' axidative burst. *Biometals.*, **23** (1) : 31 – 41.

**Galyean M.L., Perino J.L., Duff C.G.** (1999) : Interaction of cattle health/immunity and nutrition. *J. Anim. Sci.*, **77**: 1120 – 1134.

**Gennaro R., Dewald B., Horisberger U., Gubler H.U., Baggiolini M.** (1983) : A novel type of cytoplasmic granule in bovine neutrophils, *J. Cell Biol.*, **96** : 1651 – 1661.

**Gennaro R., Dolzani L., Romeo D.** (1983) : Potency of bactericidal proteins purified from the large granules of bovine neutrophils, *Infect. Immun.*, **40** : 684 – 690.

**Glasser L., Fiederlein R.L.** (1990) : The effect of various celle separation procedures on assays of neutrophil function. A critical appraisal. *Am. J. Clin. Pathol.*, **93** : 662 – 669.

**Gourreau J.M., Van Der Massen L., Braque R.** (1998) : Le défaut d'adhérence des leucocytes chez les bovins (BLAD), *Le Point Vétérinaire*, **191 (29)** : 67 – 74.

**Hachiya O., Takeda Y., Miyata H., Watanabe H., Yamashita T., Sendo F.** (1995) : Inhibition by bacterial lipopolysaccharide of spontaneous and TNF-alpha-induced human neutrophil apoptosis in vitro. *Microbiol. Immunol.* **39** : 715 – 723.

**Hampton M.B., Kettle A.J., Winterbourn C.C.** (1998) : Inside the neutrophil phagosome : Oxidants, Myeloperoxidase and Bacterial Killing. *Blood* **92** (9) : 3007 – 3017.

**Harvey, John W.** (2001) : Atlas of veterinary hematology : blood and bone marrow of domestic animals, 45 – 57.

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

**Hoebe K., Janssen E., Beutler B.** (2004) : The interface between innate and adaptative immunity. *Nat. Immunol.*, **5** : 971 – 974.

**Huang M.T., Larbi K.Y., Scheiermann C., et al.** (2006) : ICAM-2 mediates neutrophil transmigration in vivo : evidence for stimulus specificity and a role in PECAM-1-independent transmigration. *Blood*, **107** : 4721 – 4727.

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

**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. 1<sup>st</sup> edition. Philadelphia: Lea and Febiger, 417 p.

**Jenssen H., Hancock R.E.** (2009) : Antimicrobial properties of lactoferrin, *Biochimie*, **91** : 19 – 29.

**Kanazawa H., Kurihara N., Hirata K., Terakawa K., Fujiwara H., Matsushita H., Ota K., Takeda T.** (1992) : The effect of thyroid hormone on generation of free radicals by neutrophils and alveolar macrophages. *Arerugi*, **41** (2 Pt 1) : 135 – 139.

**Kaplan G.** (1977) : Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages. *Scand. J. Immunol.* **6**, 797 – 807.

**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.

**Kjersem H, Hilsted J, Madsbad S, Wandall JH, Johansen KS, Borregaard N.** (1988) : Polymorphonuclear leucocyte dysfunction during short term metabolic changes from normo- to hyperglycemia in type 1 (insulin dependent) diabetic patients. *Infection*, **16** (4) ; 215 – 221.

**Klebanoff SJ** (1967) : Iodination of bacteria : a bactericidal mechanism. *J. Exp. Med.*, **126** : 1063 – 1078.

**Kobayashi, S.D., Voyich, J.M., Braughton, K.R. et al.** (2004) : Gene expression profiling provides insight into the pathophysiology of chronic granulomatous disease *J. Immunol.*, **172** : 636 – 643.

**Koch C.C., Esteban D.J., Chin A.C., Olson M.E., Read R.R., Ceri H., Morck D.W., Buret A.G.** (2000) : Apoptosis, oxidative metabolism and interleukin-8 production in human neutrophils exposed to azithromycin: effects of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **46** (1) : 19 – 26.

**Lehrer R.I., Hanifin J., Cline M.J.** (1969) : Defective bactericidal activity in myeloperoxidase-deficient human neutrophils. *Nature*, **223** : 78 – 79.

**Li Y, Limmon GV, Imani F, et al.** (2009) : Induction of lactoferrin gene expression by innate immune stimuli in mouse mammary epithelial HC-11 cells, *Biochimie*, **91** : 58 – 67.

**Macey M.G., Jiang X.P., Veys P., Mc Carthy D., Newland A.C.** (1992) : Expression of functional antigens on neutrophils. Effects of preparation. *J. Immunol. Methods*, **149** : 37 – 42

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

**Manusco P., Nana-Sinkam P., and Peters-Golden M.** (2001) : Leukotriene B4 augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.*, **69** (4) : 2011 – 6.

**May M.J., Ager A.** (1992) : ICAM-independent lymphocyte transmigration across high endothelium : differential up-regulation by interferon  $\gamma$  tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin 1 $\beta$ . *Eur. J. Immunol.*, **22** : 219 – 226.

**May R.C., Machesky L.M.** (2001) : Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, **114** : 1061 – 1077.

**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.

**Mc Intyre 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 – 2208.

**Mehrzaad 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.

**Miller R.H., Guidry A.J., Paape M.J., Dulin A.M., Fulton L.A.** (1988) : Relationship between immunoglobulin concentrations in milk and phagocytosis by bovine neutrophils, *Am. J. Vet. Res.* **49** (1988) 42 – 45.

**Millet A.** (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 – 2010-4020.110p.*

**Mintzer D.M., Billet S.N., Chmielewski L.** (2009) : Drug-induced hematologic syndromes, *Adv. Hematol.*, 2009:495863.

**Moller A.S., Ovstebo R., Haug K.B., Joo G.B., Westvik A.B. & Kierrulf P.** (2005) : Chemokine production and pattern recognition receptor expression in whole blood stimulated with pathogen-associated molecular patterns, *Cytokine*, **32** (6) : 304 – 315.

**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.

**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.

**Nagahata H.** (2004) : Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) : a review. *J. Vet. Med. Sci.*, **66** (12) : 1475 – 1482.

**Nauseef W.M., McCormick, S., Goedken M.** (2000) : Impact of missense mutations on biosynthesis of myeloperoxidase, *Redox. Report*, **5** : 197 – 206.

**Nauseef W.M.** (2004) : Assembly of the phagocyte NADPH oxidase., *Histochem. Cell. Biol.*, **122**(4) : 277 – 91.

**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.

**Ohman L., Maluszynska G., Magnusson K.E., Stendahl O.** (1988) : Surface interaction between bacteria and phagocytic cells, *Prog. Drug Res.*, **32** : 131 – 147.

**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.

**Otonello L., Gnerre P., Bertolotto M., Mancini M., Dapino P., Russo R., Garibotto G., Barreca T., Dallergrì F.** (2004) : Leptin as uremic toxin interferes with neutrophil chemotaxis, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **15** : 2366 – 2372.

**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., Desjardins C., Guidry A.J., Miller R.H., Smith V.R. (1977) :** Response of plasma corticosteroids and circulating leucocytes in cattle following intravenous injection of different doses of adrenocorticotropin, *Am. J. Vet. Res.* 38: 1345 – 1348.

**Paape M.J., Wergin W.P., Guidry A.J., Pearson R.E. (1979) :** Leukocytes--second line of defense against invading mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.*, **62** 135 – 153.

**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**: 77 – 482.

**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.

**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 leukocytes 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.

**Pierce A., Legrand D., Mazurier J. (2009) :** La lactoferrine : une protéine multifonctionnelle, *Medecine/Science*, 25 : 361 – 369.

**Pramanik S.S., Pramanik T., Mondal S.C., Chanda R.** (2007) : Number, maturity and phagocytic activity of neutrophils in the three trimesters of pregnancy. *East Mediterr Health J.*, **13** (4) : 862 – 7.

**Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C., and Hinchcliff K.W.** (2007) : *Veterinary Medicine*. 10th edition : pp 2047 – 2049.

**Rainard P., Riollot C.** (2003) : Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reprod. Nutr. Dev.*, **43** : 439 – 457.

**Rausch P.G., Moore T.G.** (1975) : Granule enzymes of polymorphonuclear neutrophils : A phylogenetic comparison, *Blood*, **46** : 913 – 919.

**Reed J.C.** (2000) : Mecanismos of apoptosis. *Am. J. Pathol.* **157**: 1415 – 1430.

**Reeves E.P., Lu H., Jacobs H.L., Messina C.G., Bolsover S., et al.** (2002) : Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux, *Nature*, **416** : 291 – 97.

**Rinaldi, M., Moroni, P. Paape, M.J. & Bannerman, D.** (2007) : Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. *Vet. Immunol. Immunopath.*, **115** : 107 – 125.

**Roitt I., Brostoff J., Male D.** (2001) : *Immunology, Sixth Edition*. 55.

**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.

**Savoini A., Marzari R., Dolzani L., Serrano D., Graziosi G., Gennaro R., Romeo D.** (1984) : Wide-spectrum antibiotic activity of bovine granulocyte polypeptides, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **26** : 405 – 407.

**Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F.** (2003) : Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.*, **34** (5) : 475 – 91.

**Segal A.W.** (2005) : How neutrophils kill microbes, *Annu. Rev. Immunol.*, **23** : 197 – 223.

**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.J., Heyneman R., Massart-Leen A.** (1999) : Diapedesis across mammary epithelium reduces phagocytic and oxidative burst of bovine neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **68** : 169 – 176.

**Sordillo LM, Doymaz MZ, Oliver SP** (1989) : Morphological study of chronic *Staph. aureus* mastitis in the lactating bovine mammary gland, *Res. Vet. Sci.* **47** : 247 – 252.

**Spears W.J.** (2000) : Micronutrients and immune function in cattle, *Proceedings of the nutrition society.* **59**: 587 – 594.

**Stelwagen K., Carpenter E., Haigh B., Hodgkinson A., Wheeler T.T.** (2009) : Immune components of bovine colostrum and milk, *J. Anim. Sci.*, **87** : 3 – 9.

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

**Suriyasathaporn W., Heuer C., Noordhuizen-Stassen E.N., Schukken Y.H.** (2000) : Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. *Vet. Res.*, **31** (4) : 397 – 412.

**Symonds H.W., Mather D.L., Collis K.A.** (1981) : The maximum capacity of the liver of the adult dairy cow to metabolize ammonia, *Br. J. Nutr.*, **46** (3) : 481 – 6.

**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.

**Tizard I.R.** (2004) : *Veterinary Immunology : An Introduction, Seventh edition.* 10 – 34.

**Tsuda H., Sekine K., Fujita K., et al.** (2002) : Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms – a review of experimental and clinical studies, *Biochem. Cell. Biol.*, **80** : 131 – 6.

**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.

**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.

**Vanholder R., De Smet R., Waterloosn M.A., Van Landschoot N., Vogele P., Hoste E., Ringoir S.** (1995) : Mechanisms of uremic inhibition of phagocyte reactive species production : characterisation of the role of p-cresol, *Kidney Int.*, **47** : 510 – 517.

**Van Oostveldt K., Vangroenweghe F., Dosogne H., Burvenich C.** (2001) : Apoptosis and necrosis of blood and milk polymorphonuclear leukocytes in early and midlactating healthy cows, *Vet. Res.* **32** : 617 – 622.

**Van Oostveldt K., Paape M.J., Dosogne H., Burvenich C.** (2002) : Effect of apoptosis on phagocytosis, respiratory burst and CD18 adhesion receptor expression of bovine neutrophils, *Domest. Anim. Endocrinol.* **22** : 37 – 50.

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

**Ward P.P., Paz E., Conneely O.M.** (2005) : Multifunctional roles of lactoferrin : a critical overview, *Cell Mol Life Sci*, **62** : 2540 – 2548.

**Watson F., Robinson J.J., Edwards S.W.** (1992) : Neutrophil function in whole blood and after purification – changes in receptor expression, oxidase activity and responsiveness to cytokines. *Biosci. Rep.*, **12** : 123 – 133.

**Weber P.S., Madsen S.A., Smith G.W., Ireland J.J., Burton J.L.** (2001) : Pre-translational regulation of neutrophil L-selectin in glucocorticoid-challenged cattle, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **83** : 213–240.

**Werling D., Jungi T.W.** (2003) : TOLL-like receptors linking innate and adaptative immune response, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **91** (1) : 1 – 12.

**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.

**Whyte M.K., Meagher L.C., MacDermot J., Haslett C.** (1993) : Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis, *J. Immunol.* **150** : 5124 – 5134.

**Woodfin A., Voisin M.B., Imhof B.A., Dejana E., Engelhardt B., Nourshargh S.** (2009) : Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1, *Blood*, **113**: 6246 – 6257.

**Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Mathison J.C.** (1990) : CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS bonding protein, *Science*, **249** : 1431 – 1433.

**Zarbock A., Schmolke M., Spieker T., Jurk K., Van Aken H., Singbartl K.** (2006) : Acute uremia but not renal inflammation attenuates aseptic acute lung injury : a critical role for uremic neutrophils, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **17** (11) : 3124 – 3131.

**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.

**Zhao X, Lacasse P.** (2008) : Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control, *J. Anim. Sci.*, **86** (13 Suppl) : 57 – 65.

**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.

# Annexes

*Annexe 1 : Analyses des rations distribuées (logiciel Larelev® 2009)*

## 1. Analyses des fourrages

<b>Luzerne</b>	<b>Unités</b>	<b>/brut</b>	<b>/MS</b>
MS	g/kg	902,0	1000
<u>Constituants selon schéma de Weende</u>	-		
MAT	g/kg	139,9	155,1
CB	g/kg	331,0	367,0
Cendres brutes	g/kg	101,8	112,9
<u>Valeurs alimentaires</u>	-		
UFL	/kg	0,55	0,61
UFV	/kg	0,46	0,51
PDIA	g/kg	43	48
PDIE	g/kg	80	89
PDIN	g/kg	88	98

<b>Foin</b>	<b>Unités</b>	<b>/brut</b>	<b>/MS</b>
MS	g/kg	898,0	1000
<u>Constituants selon schéma de Weende</u>	-		
MAT	g/kg	95,5	106,3
CB	g/kg	332,0	369,7
Cendres brutes	g/kg	69,3	77,1
<u>Valeurs alimentaires</u>	-		
UFL	/kg	0,57	0,64
UFV	/kg	0,48	0,54
UEL	/kg	0,99	1,1
UEB	/kg	1,06	1,18
PDIA	g/kg	27	30
PDIE	g/kg	67	75
PDIN	g/kg	62	69

## 2. Ration quotidienne pré-essai (12% MAT)

### Quantités distribuées (kg MB/jour)

Luzerne DH	(kg)	7.50
Foin	(kg)	7.50
Maïs	(kg)	1.00
Tourteau de soja 48	(kg)	0.500
Urée	(kg)	0.00

### Contraintes calculées

	Valeur	Apport Optimum	recommandé Minimum	Maximum	Adaptation*	Production sans adapt.	correspond. avec adapt.
MS totale (kg)	15.10						
Concentrés (% MS)	8.65						
Matière Brute (kg)	16.50						
MS (%)	91.30						
UEB	15.00	12.30	12.30	12.30			
UFV	9.15	8.09	8.09	8.89		809	
UFV (/ kg MS)	0.608						
PDIE (g)	1210	817*	817*		98.00	non calc.	non calc.
PDIN (g)	1160			1360			
(PDIE - PDIN) / UFL (g)	5.90	0.00		14.00			
PDIE (g/kg MS)	80.50						
PDIN (g/kg MS)	76.90						
Matières azotées totales (% MS)	12.10						
Cellulose Brute (% MS)	31.70		10.00				
NDF (% MS)	53.10						
(ADF (% MS))	0.415						
Amidon (% MS)	4.26						
(Amidon + Sucres (% MS))	6.37						
(Ca abs. Rts (g))	9.70		22.00	32.90		non calc.	
Ca (g)	173						
P abs. Rts (g)	29.40		17.60	35.30		2490	
P (g)	42.50						
Mg (g)	28.90		25.70			2220	
Prix (€)	0.00						

## 3. Ration quotidienne 14% MAT

### Quantités distribuées (kg MB/jour)

Luzerne DH	(kg)	10.00
Foin	(kg)	5.00
Maïs	(kg)	1.30
Tourteau de soja 48	(kg)	1.00
Urée	(kg)	0.00

### Contraintes calculées

	Valeur	Apport Optimum	recommandé Minimum	Maximum	Adaptation*	Production sans adapt.	correspond. avec adapt.
MS totale (kg)	15.70						
Concentrés (% MS)	12.70						
Matière Brute (kg)	17.30						
MS (%)	90.90						
UEB	14.70	12.30	12.30	12.30			
UFV	9.89	8.09	8.09	8.89		943	
UFV (/ kg MS)	0.629						
PDIE (g)	1390	817*	817*		98.00	non calc.	non calc.
PDIN (g)	1440			1460			
(PDIE - PDIN) / UFL (g)	-4.72	0.00		14.00			
PDIE (g/kg MS)	88.50						
PDIN (g/kg MS)	91.50						
Matières azotées totales (% MS)	14.10						
Cellulose Brute (% MS)	31.20		10.00				
NDF (% MS)	49.00						
(ADF (% MS))	0.679						
Amidon (% MS)	5.30						
(Amidon + Sucres (% MS))	8.18						
(Ca abs. Rts (g))	6.47		22.40	33.60		non calc.	
Ca (g)	213						
P abs. Rts (g)	31.40		18.20	36.40		2720	



P (g)	44.30		
Mg (g)	29.40	25.70	2430
Prix (€)	0.00		

#### 4. Ration quotidienne 20% MAT, dont 3% par urée

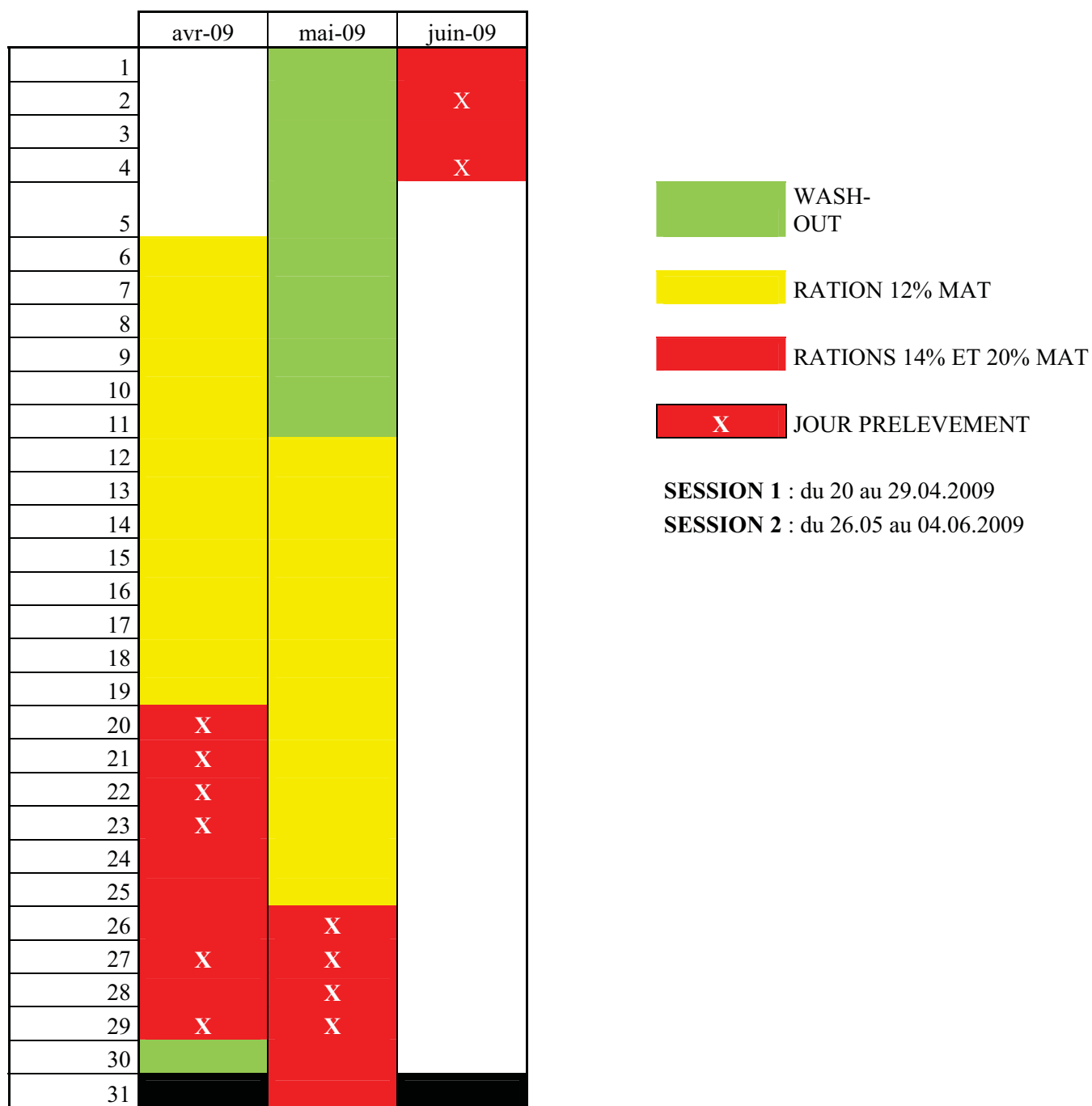
##### Quantités distribuées (kg MB/jour)

Luzerne DH	(kg)	10.00
Foin	(kg)	5.00
Maïs	(kg)	0.00
Tourteau de soja 48	(kg)	2.30
Urée	(kg)	0.170

##### Contraintes calculées

	Valeur	Apport Optimum	recommandé Minimum	Maximum	Adaptation*	Production sans adapt.	correspond. avec adapt.
MS totale (kg)	15.90						
Concentrés (% MS)	13.70						
Matière Brute (kg)	17.50						
MS (%)	91.10						
UEB	14.80	12.30	12.30	12.30			
UFV	9.87	8.09	8.09	8.89		941	
UFV (/ kg MS)	0.621						
PDIE (g)	1580	817*	817*		98.00	non calc.	non calc.
PDIN (g)	2030			1570			
(PDIE - PDIN) / UFL (g)	-45.60	0.00		14.00			
PDIE (g/kg MS)	99.30						
PDIN (g/kg MS)	128						
Matières azotées totales (% MS)	20.00						
Cellulose Brute (% MS)	31.20		10.00				
NDF (% MS)	48.60						
(ADF (% MS))	1.06						
Amidon (% MS)	0.00						
(Amidon + Sucres (% MS))	3.39						
(Ca abs. Rts (g))	6.47		22.50	33.80		non calc.	
Ca (g)	217						
P abs. Rts (g)	34.70		18.30	36.70		3220	
P (g)	49.00						
Mg (g)	31.80		25.70			3670	
Prix (€)	0.00						

***Annexe 2 : Calendrier expérimental***



A chaque « jour prélèvement » correspondent :

- analyses biochimiques à H8, H9, H10, H12, H14, H16 et H18
- analyses immunologiques à H9

**Annexe 3** : Purification des neutrophiles : protocole expérimental

1. Les tubes ACD sont centrifugés pendant 20 minutes à 1000g. Le plasma et buffy coat sont prélevés puis placés dans un tube Falcon® de 25 ml.
2. Deux volumes d'une solution de NaCl 0,2% conservée dans la glace sont ajoutés. Le tube Falcon® est agité par retournements successifs. Cette étape permet la lyse des érythrocytes par choc osmotique.
3. Après exactement 45 secondes, ½ volume d'une solution de NaCl 3,7% est ajouté. Ceci restaure l'isotonicité de la solution.
4. Centrifuger le tube pendant 2 minutes à 500g, à 4°C.
5. Le culot est conservé puis remis en suspension dans 10 ml de HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, Invitrogen) (Grand Island Biological Co., Grand Island, NY, USA), sans Ca ni Mg. Le tube est centrifugé à 500g pendant 1 minute à 4°C. Cette étape est répétée une fois.
6. Répéter l'étape de lyse si nécessaire.

**Annexe 4** : Expression des marqueurs de surface CD11b et CD62L : protocole expérimental

**Matériel :**

Tubes FACS

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

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

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

**Méthode :**

1. Les solutions indépendantes d'anticorps sont préparées à l'avance et conservées à 4°C.
2. Les analyses sont réalisées en triplicate.  
Placer 100 µl de suspension cellulaire (à 5.10<sup>6</sup> cellules.ml<sup>-1</sup>) dans chacun des trois tubes.  
Ajouter 100 µl de solution de chaque anticorps par tube.  
Trois tubes supplémentaires servent de contrôle :
  - 3.1. un contient seulement la suspension cellulaire (temoin négatif)
  - 3.2. les deux autres contiennent la suspension cellulaire et un seul type d'anticorps (réglage du cytomètre).
3. Laisser incuber pendant 30 minutes à 4°C
4. Centrifuger à 500g pendant 30 minutes, et laver avec du tampon FACS. Répéter l'étape une fois.
5. Reprendre dans 400µl de tampon FACS.

**Annexe 5** : *Protocole de préparation du zymozan activé*

1. Un gramme de zymozan (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) est ajouté à 100 ml d'une solution froide de HBSS avec Calcium et Magnésium. L'ensemble est homogénéisé pendant 1 minute.
2. 100 ml de sérum bovin sont ajoutés aux 100 ml de zymozan en suspension. L'ensemble est placé sous agitation pendant 1 heure à température ambiante, afin de permettre l'opsonisation de l'antigène particulaire.
3. Le zymozan opsonisé est sédimenté par centrifugation à 250g pendant 10 minutes.
4. Deux lavages avec 200 ml d'une solution à 0,01 mol.l<sup>-1</sup> d'EDTA (Ethylenediamine-tetraacetic acid) avec agitation pendant 15 minutes entre les lavages permettent de désagréger le culot de zymozan.
5. Le culot final est mis en suspension dans 100 ml d'HBSS et congelé en aliquotes à -20°C.

NB : pour la préparation d'OZP à d'autres concentrations, le culot final est dilué dans la dose d'HBSS adéquate.

**Annexe 6** : Test de chimioluminescence au luminol : protocole expérimental

**Réactifs :**

HBSS

OZP à différentes concentrations : 250, 80 et 25  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Avant son utilisation l'OZP est dissocié par sonication pendant 3 minutes.

PMA à différentes concentrations : 1, 0,1, et 0,01  $\mu\text{M}$ .

**Protocole :**

1. 50  $\mu\text{l}$  de HBSS (bruit de fond : « NO STIM ») ou les différentes concentrations de PMA ou d'OZP et 50  $\mu\text{l}$  de luminol (2 mM) sont ajoutés à  $2 \times 10^6$  GNN en suspension dans 100  $\mu\text{l}$  de HBSS dans les puits d'une plaque de 96 puits (voir schéma de la plaque ci-dessous).

Des puits de la plaque sont laissés sans cellules, seul le luminol y est ajouté (blanc technique : « NO CELL »). Le volume est ajusté à 200 $\mu\text{l}$  avec du milieu HBSS.

Toutes les mesures sont effectuées en triplicate.

	A			B			C			D		
PMA1												
PMA0.1												
PMA0.01												
No Stim												
OZP2.5												
OZP0.8												
OZP0.25												
No Cell												

2. Dans la seconde qui suit l'ajout des cellules, la plaque est introduite dans le lecteur de microplaques TECAN préchauffé à 38,5°C. Vingt-quatre cycles de mesure de 5 minutes chacun sont effectués, le premier cycle démarrant immédiatement après l'introduction de la plaque.

**Annexe 7** : Test de bactéricidie : protocole expérimental

**Réactifs :**

*Staphylococcus aureus*, [ $1.10^{10}$  bactéries.ml<sup>-1</sup>], -80°C

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

Saponin 2% PBS, filtrée 0.2µm

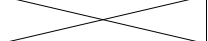
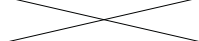
Diluer au 1/10 dans PBS

MTT 2 mg.ml<sup>-1</sup>, congelé à -20°C ; prêt à l'emploi

Isopropanol

**Protocole :**

1. 100 µl de suspension de neutrophiles purifiés à  $5.10^6$  cellules.ml<sup>-1</sup> sont placés dans chaque puits.
2. 50 µl de suspension bactérienne sont ajoutés :
4. à une concentration de  $1.10^8$  cellules.ml<sup>-1</sup> dans les puits à incubation
5. à différentes concentrations dans les puits de préparation de la courbe standard de dilution (voir schéma du plan de plaque page suivante).
3. Les bactéries et neutrophiles sont laissés en incubation à 37°C.
3. Après 1 heure d'incubation, sont ajoutés 50 µl de Saponin 0,2% et 50 µl de MTT 2 mg.ml<sup>-1</sup>.
4. La plaque est laissée en incubation pendant 45 minutes.
5. La densité optique est mesurée à 560 nm.

1. Animal	2.	3.	4.	5.
A			●	●
A			●	●
B			●	●
B			●	●
C			●	●
C			●	●
D			Blanc	Blanc
D				

Concentration des bactéries  
de la courbe standard de  
dilution (Bactéries.ml-1)

$10^8$
$90.10^6$
$50.10^6$
$25.10^6$
$12.10^6$
$6.10^6$

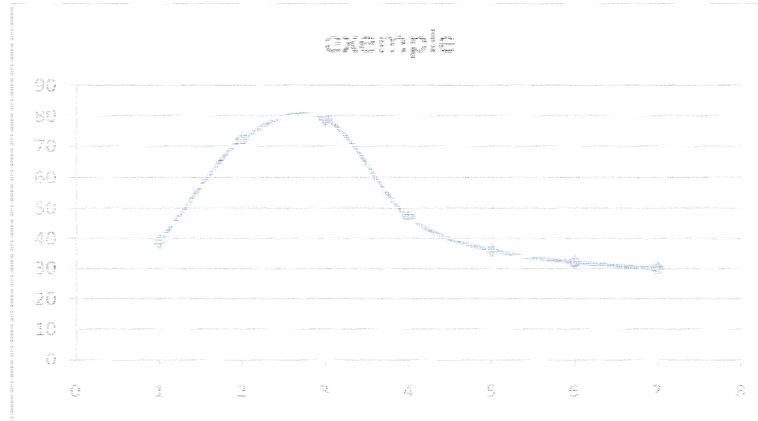
50µl de bactéries ( $1.10^8$ .ml-1)  
+ 100µl de suspension cellulaire par puits

Courbe standard de dilution  
(50µl par puits)

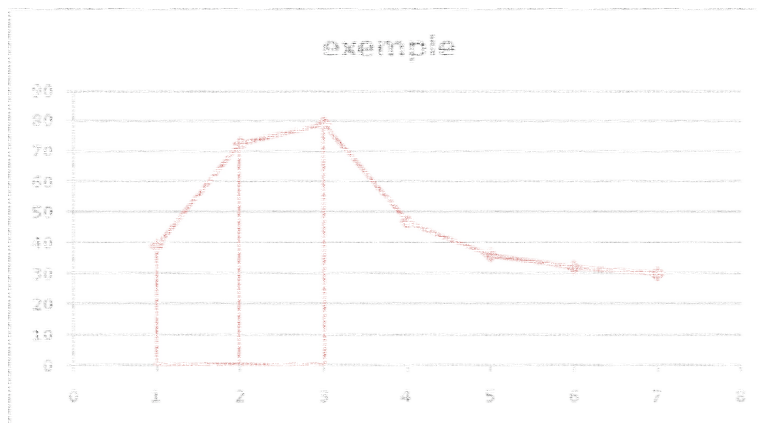


**Annexe 8** : Méthode de calcul de l'aire sous la courbe de la cinétique d'un paramètre biochimique à travers un exemple

Soit une courbe :



L'aire globale sous la courbe est approximativement celle de la somme des aires des trapèzes dessinés tels que dans l'exemple suivant :



Soit aire sous la courbe de l'exemple est égale à :

$$(2-1) \times (Y(1)+Y(2))/2 + \dots + (7-6) \times (Y(6)+Y(7))/2$$

Appliquée à un paramètre biochimique dans notre étude, on obtient :

$$(9-8) \times (H_8+H_9)/2 + (10-9) \times (H_9+H_{10})/2 + \dots + (18-16) \times (H_{16}+H_{18})/2$$

*Soit après simplification :*

$$1/2 \times H_8 + H_9 + 3/2 \times H_{10} + 2 \times H_{12} + 2 \times H_{14} + 2 \times H_{16} + H_{18}$$

*(avec  $H_i$  = valeur du paramètre étudié à l'heure  $i$  du prélèvement)*





Toulouse, 2011

Nom : GANNAC

Prénom : Samuel

Impact de l'excès aigu d'azote soluble dans la ration des bovins sur les fonctions des neutrophiles sanguins

#### Résumé

Le rôle d'un excès d'azote alimentaire dans l'augmentation de la fréquence des maladies infectieuses chez les bovins, bien que souvent évoqué, n'a jamais été démontré. Nous avons fait l'hypothèse que les fonctions des neutrophiles, qui sont les premières cellules immunitaires à être mobilisées au cours de la réponse antibactérienne, pouvaient être modifiées par l'excès aigu d'azote dans la ration. Pour cela, la numération, l'expression de récepteurs membranaires, le pouvoir oxydatif, et la bactéricidie des neutrophiles ont été évalués chez quatre mâles castrés consommant des rations contenant 14 et 20% d'azote. Les résultats obtenus montrent que l'augmentation d'azote soluble alimentaire modifie la numération et l'expression de CD62L qui participe à l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium vasculaire. Une des conséquences de ces modifications peut être une plus grande activité de la diapédèse basale et donc possiblement une exacerbation de la réponse inflammatoire lors d'infection.

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

---

Impact of an acute excess of dietary soluble nitrogen on the functions of blood neutrophils in cattle.

#### Summary

In ruminants, a role of nitrogen excess in the diet is often evoked for inducing an increase in the frequency of bacterial infections, although a link was never formally demonstrated. For that purpose, blood cell count, membrane receptor expression, oxidative burst, and killing activity of blood neutrophils were evaluated in four steers receiving alternatively rations with 14 or 20 % of total crude protein. The results show that an increase of soluble nitrogen in the diet decreases the numeration of blood neutrophils and increases expression of CD62L with possibly an increase of cell adhesion to the vascular endothelium. Indeed, spontaneous diapedesis might be heightened and tissue inflammation exacerbated upon infection, when dietary nitrogen intake is over the recommendation limits.

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