

# LES MARQUEURS DE L'INFLAMMATION CHEZ LES BOVINS :

Nature, physiopathologie et intérêt  
diagnostique

A notre jury,

**Monsieur le Professeur LE GAILLARD**

Professeur des Universités  
Praticien hospitalier  
Biochimie et Biologie moléculaire

*Qui nous a fait l'honneur de présider ce jury de thèse, hommage respectueux*

**Monsieur le Professeur SCHELCHER**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour

*Qui nous a appris la science du diagnostic  
En témoignage de notre collaboration, passée et à venir*

**Monsieur le Professeur BRAUN**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Physique et Chimie biologiques et Médicales

*Qui nous a fait l'honneur de juger ce travail, sincères remerciements*

A Candice,

A Monsieur Jacques Gallet,

A mes parents,

A mes grands-parents,

A ma sœur et mon frère,

A Medhi et Anne Françoise,

A tout le personnel du service de Pathologies des Ruminants

# SOMMAIRE

|                              |    |
|------------------------------|----|
| TABLE DES ILLUSTRATIONS..... | 10 |
| TABLE DES TABLEAUX .....     | 11 |
| INTRODUCTION .....           | 13 |

## PREMIÈRE PARTIE

### NATURE, FONCTIONS, ET METHODES D'ANALYSE DES MARQUEURS DE L'INFLAMMATION

|   |           |
|---|-----------|
| <b><u>I - PARAMETRES HEMATOLOGIQUES .....</u></b>   | <b>16</b> |
| I.1 - DEFINITION.....   | 16        |
| I.2 - METHODES D'ANALYSE.....   | 16        |
| <b><u>II - PROTEINES DE LA PHASE AIGUË.....</u></b>   | <b>17</b> |
| II.1 - DEFINITION.....  | 17        |
| II.1.1 - Classification.....  | 17        |
| II.1.2 - Différences inter-espèces (tableau 2) .....  | 18        |
| II.2 - NATURE ET PROPRIETES BIOCHIMIQUES DES PROTEINES DE LA PHASE AIGUË CHEZ LES BOVINS..... | 21        |
| a) haptoglobine .....   | 21        |
| b) SAA.....   | 22        |
| c) $\alpha_1$ -AGP .....  | 22        |
| II.3 - FONCTIONS DES PROTEINES DE LA PHASE AIGUË.....   | 23        |
| II.3.1 - Fonctions antiprotéasiques des PPA.....  | 23        |
| II.3.2 - Fonctions épuratrices et antioxydantes des PPA .....                                 | 24        |
| II.3.3 - Fonction de restauration tissulaire des PPA .....                                    | 25        |
| II.3.4 - Fonctions des protéines négatives de la phase aiguë.....                             | 26        |

|   |           |
|---|-----------|
| II.4 - DOSAGE DES MARQUEURS PROTEIQUES .....                                    | 26        |
| II.4.1 - Protéines totales et globulines .....                                  | 26        |
| II.4.2 - Dosage de l'haptoglobine.....  | 27        |
| a) Spectrophotométrie différentielle .....                                      | 27        |
| b) Méthodes biochimiques.....   | 28        |
| c) Techniques immunochimiques .....   | 30        |
| I.1.1 - Dosage de la Sérum Amyloid A (SAA).....                                 | 34        |
| I.1.2 - Dosage de l' $\alpha_1$ -AGP.....                                       | 35        |
| I.1.3 - Dosage de la céruloplasmine .....                                       | 35        |
| I.1.4 - Dosage de l' $\alpha_1$ -protéase inhibitor ( $\alpha_1$ -PI) .....     | 36        |
| I.1.5 - Dosage du fibrinogène .....   | 36        |
| <b>II - PARAMETRES DU LCR .....</b>   | <b>37</b> |
| II.1 - ASPECTS MACROSCOPIQUES ET PHYSIQUES .....                                | 38        |
| II.2 - ANALYSE CYTOLOGIQUE.....   | 38        |
| II.3 - ANALYSE BIOCHIMIQUE.....   | 39        |
| II.3.1 - Protéines : albumine, globulines et protéines de la phase aiguë.....   | 40        |
| II.3.2 - Autres paramètres biochimiques .....                                   | 40        |
| <b>III - PARAMETRES DU LAIT .....</b>   | <b>42</b> |
| III.1 - COMPTAGES CELLULAIRES .....   | 42        |
| III.1.1 - Comptage des cellules somatiques (Somatic Cell Count = CCS).....      | 42        |
| III.1.2 - Californian Mastitis Test (CMT) .....                                 | 42        |
| III.1.3 - Comptage cellulaire différentiel (Differential Cell Count = DCC)..... | 43        |
| III.2 - PROTEINES DE LA PHASE AIGUË .....                                       | 43        |

|  |           |
|--|-----------|
| III.3 - AUTRES PARAMETRES .....                | 43        |
| <b>IV - ANALYSE DU LIQUIDE ABDOMINAL .....</b> | <b>44</b> |
| IV.1 - TECHNIQUE DE PRELEVEMENT .....          | 44        |
| IV.2 - MARQUEURS D'INTERET DIAGNOSTIQUE .....  | 44        |
| IV.2.1 - Aspects macroscopiques .....          | 44        |
| IV.2.2 - Paramètres cytologiques .....         | 45        |
| IV.2.3 - Paramètres biochimiques .....         | 45        |

## DEUXIÈME PARTIE

### PHYSIOPATHOLOGIE DES MARQUEURS DE L'INFLAMMATION

|  |           |
|--|-----------|
| <b>V - SYNTHÈSE ET RECRUTEMENT DES MARQUEURS .....</b>     | <b>47</b> |
| V.1 - MOBILISATION DES LEUCOCYTES .....                    | 47        |
| V.1.1 - schéma général .....                               | 47        |
| V.2 - SYNTHÈSE DES PROTEINES DE LA PHASE AIGUË .....       | 49        |
| V.2.1 - Schéma général .....                               | 49        |
| a) Synthèse hépatique .....                                | 49        |
| b) Synthèse extra-hépatique .....                          | 49        |
| V.2.2 - Action des cytokines et des glucocorticoïdes ..... | 52        |
| a) Les cytokines .....                                     | 52        |
| b) Les glucocorticoïdes .....                              | 55        |
| c) Autres facteurs de régulation .....                     | 55        |
| V.2.3 - Mécanismes intracellulaires .....                  | 57        |
| a) Induction .....   | 57        |

|   |           |
|---|-----------|
| b) Arrêt de la synthèse .....   | 61        |
| c) Passage à la chronicité.....   | 64        |
| <b><u>II - VALEURS USUELLES ET VARIATIONS EN DEHORS DU CONTEXTE</u></b> |           |
| <b><u>INFLAMMATOIRE.....</u></b>  | <b>65</b> |
| II.1 - FORMULE SANGUINE .....   | 65        |
| II.1.1 - Valeurs usuelles.....  | 65        |
| II.1.2 - Variations dues à l'âge et au sexe .....                       | 66        |
| II.1.3 - Variations dues au stres.....                                  | 68        |
| II.1.4 - Variations dues au statut physiologique .....                  | 69        |
| II.1.5 - Variations iatrogènes.....                                     | 69        |
| II.2 - PROTEINES DE LA PHASE AIGÜE .....                                | 69        |
| II.2.1 - Valeurs usuelles.....  | 69        |
| II.2.2 - Variations dues à l'âge et au sexe .....                       | 71        |
| II.2.3 - Variations dues au stress .....                                | 72        |
| II.2.4 - Variations dues au statut physiologique .....                  | 73        |
| II.2.5 - Variations iatrogènes et alimentaires.....                     | 75        |
| II.3 - LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN (LCR) .....                            | 76        |
| II.3.1 - Valeurs usuelles et variations dues à l'âge.....               | 76        |
| II.4 - PARAMETRES DU LAIT .....   | 77        |
| II.4.1 - Valeurs usuelles et variations dues à l'âge.....               | 77        |
| II.4.2 - Variations dues au stress .....                                | 78        |
| II.4.3 - Variations dues au statut physiologique .....                  | 78        |
| a) Comptage des cellules somatiques .....                               | 78        |

|  |                                    |
|--|------------------------------------|
| b) Albumine et protéines de la phase aiguë .....   | 80                                 |
| II.5 - LIQUIDE DE PONCTION ABDOMINALE .....  | 81                                 |
| II.6 - FACTEUR PATHOGENES INTERFERANT AVEC L'EVALUATION MARQUEURS DE<br>L'INFLAMMATION ..... | 81                                 |
| II.6.1 - Déshydratation.....   | 81                                 |
| II.6.2 - Jeûne, cétose et stéatose hépatique.....  | 82                                 |
| II.6.3 - Atteintes rénales .....   | 83                                 |
| II.6.4 - Atteintes intestinales.....   | 84                                 |
| II.6.5 - Atteintes hépatiques.....   | 85                                 |
| II.6.6 - Parasitisme.....  | 85                                 |
| II.6.7 - Maladies systémiques.....   | 86                                 |
| <b>III - <u>VARIATIONS LORS DE REACTION INFLAMMATOIRE</u>.....</b>                           | <b>88</b>                          |
| III.1 - CINETIQUES DE VARIATION .....  | 88                                 |
| III.1.1 - Cinétique de variation des paramètres hématologiques .....                         | 88                                 |
| a) Cinétique précoce .....   | <b>Erreur ! Signet non défini.</b> |
| b) Evolution lors de réaction inflammatoire aiguë avec résolution.....                       | 90                                 |
| c) Cinétique lors de réaction inflammatoire chronique .....                                  | 90                                 |
| III.1.2 - Cinétique des marqueurs protéiques .....   | 91                                 |
| a) Phase précoce .....   | 91                                 |
| b) Cinétique lors d'inflammation aiguë.....  | 92                                 |
| c)Inflammation chronique .....   | 97                                 |
| III.1.3 - Cinétique des marqueurs du lait.....   | 99                                 |
| a) Mammite aiguë .....   | 99                                 |

|  |     |
|--|-----|
| b) Mammites chroniques .....   | 100 |
| III.2 - LIAISON DES MARQUEURS AVEC LA SEVERITE ET LA GRAVITE DE L'INFLAMMATION ..... | 100 |
| III.2.1 - Paramètres hématologiques.....   | 100 |
| III.2.2 - Marqueurs protéiques.....  | 101 |
| a) Corrélation avec les signes cliniques.....  | 101 |
| b) Corrélation avec les lésions.....   | 103 |
| III.2.3 - Paramètres du LCR .....  | 104 |
| III.2.4 - Paramètres du lait.....  | 105 |
| c) Protéines de la phase aiguë.....  | 105 |
| d) Comptage des cellules somatiques .....  | 105 |

## TROISIÈME PARTIE

### APPLICATIONS ET PERSPECTIVES EN MEDECINE BOVINE

|   |            |
|---|------------|
| <b>IV - MISE EN EVIDENCE D'UN FOYER INFLAMMATOIRE .....</b> | <b>108</b> |
| IV.1 - PARAMETRES SANGUINS .....                            | 108        |
| IV.1.1 - Protéines de la phase aiguë .....                  | 108        |
| IV.1.2 - Numération formule.....                            | 112        |
| IV.2 - MESURE DANS LE LAIT .....                            | 113        |
| IV.2.1 - Mammites cliniques.....                            | 113        |
| IV.2.2 - Mammites sub-cliniques .....                       | 114        |
| IV.3 - PARAMETRES DU LCR .....                              | 116        |
| IV.4 - PARACENTESE ABDOMINALE.....                          | 116        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>V - APPRECIATION DE L'ANCIENNETE .....</b>                                      | <b>118</b> |
| V.1 - NUMERATION FORMULE ET PROTEINES DE LA PHASE AIGUË .....                      | 118        |
| V.2 - PROTEINES TOTALES SERIQUES .....   | 120        |
| <b>VI - SUIVI THERAPEUTIQUE ET POST-OPERATOIRE ; PRONOSTIC.....</b>                | <b>121</b> |
| VI.1 - MARQUEURS SANGUINS.....   | 121        |
| VI.1.1 - Suivi cliniques et pronostic .....  | 121        |
| VI.1.2 - Suivi post-opératoire.....  | 123        |
| VI.2 - MARQUEURS DU LAIT.....  | 125        |
| VI.3 - MARQUEURS DU LCR.....   | 125        |
| VI.4 - MARQUEURS DU LIQUIDE DE PONCTION ABDOMINALE.....                            | 126        |
| <b>VII - ORIENTATION CAUSALE .....</b>   | <b>127</b> |
| VII.1 - PARAMETRES SANGUINS .....  | 128        |
| VII.2 - MARQUEURS DU LCR.....  | 129        |
| VII.2.1 - Atteintes inflammatoires <i>versus</i> atteintes non inflammatoires..... | 129        |
| VII.2.2 - Atteintes inflammatoires.....  | 130        |
| VII.3 - LIQUIDE DE PONCTION ABDOMINALE.....  | 134        |
| VII.4 - MARQUEURS DU LAIT .....  | 135        |
| <b>CONCLUSIONS .....</b>   | <b>136</b> |
| <b>REFERENCES .....</b>  | <b>139</b> |

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

|   |     |
|---|-----|
| Figure 1 : structure de l'haptoglobine. ....  | 21  |
| Figure 2 : schéma simplifié de l'activation de la granulopoïese suite à l'inflammation. ....  | 48  |
| Figure 3 : mécanisme général de l'induction de la synthèse des protéines de la phase aiguë lors de la réaction inflammatoire chez les bovins .....  | 50  |
| Figure 4 : mécanisme intracellulaire proposé pour l'induction de la synthèse des PPA chez l'homme .....   | 58  |
| Figure 5 : Intervention des inhibiteurs des facteurs de transcription et des facteurs de répression de la transcription dans l'arrêt de la transcription des gènes codant pour les protéines de la phase aiguë chez l'homme.....  | 62  |
| Figure 6 : Intervention de l'IL-1 Receptor Antagonist et des récepteurs "appâts" dans la régulation de la transmission du message de transcription des gènes des PPA chez l'homme .....   | 62  |
| Figure 7 : variation des différentes populations leucocytaires selon l'âge chez les jeunes bovins.....  | 67  |
| Figure 8 : suivi des CCS moyens des quartiers non-infectés infectés par des pathogènes mineurs et infectés par des pathogènes majeurs en fonction du numéro de traite post-partum .....   | 79  |
| Figure 9 : dynamique de la réponse leucocytaire aux infections bactériennes aiguës chez les bovins,.....  | 89  |
| Figure 10 : cinétique de variation précoce des différentes populations leucocytaires sanguines lors d'inoculation intramammaire expérimentale d'endotoxine d'E.coli.....  | 89  |
| Figure 11 : Cinétique précoce de l'haptoglobine et de la SAA chez 4 génisses suite à l'administration intra-trachéale de $1,2 \cdot 10^{11}$ CFU de <i>M. hemolytica</i> A1.....  | 91  |
| Figure 12 : concentrations sériques d'haptoglobine , alpha-1 AGP , alpha-1PI , céruloplasmine et fibrinogène, chez quatre veaux, suite à l'injection sous-cutanée d'essence de térébenthine. ....   | 93  |
| Figure 13 : cinétique des principales protéines de la phase aiguë, explorées chez l'homme suite à une inflammation aiguë avec résolution .....  | 95  |
| Figure 14 : évolution des concentrations en AGP chez 8 bovins. ....   | 98  |
| Figure 15 : cinétique de variation des concentrations plasmatiques en fibrinogène, haptoglobine, $\alpha_1$ -AGP et $\alpha_1$ -PI pour le groupe cliniquement sévèrement atteint et cliniquement moins atteints suite à l'inoculation intramammaire d' <i>A.pyogenes</i> , <i>F. necrophorum</i> et <i>P. indolicus</i> . .... | 102 |
| Figure 16 : concentrations plasmatiques en SAA et CRP en fonction de la nature du processus infectieux .....  | 127 |

## TABLE DES TABLEAUX

|   |     |
|---|-----|
| Tableau 1 : principales protéines de la phase aiguë chez l'homme .  | 18  |
| Tableau 2 : variabilité des profils de synthèse des PPA chez les mammifères..   | 20  |
| Tableau 3 : techniques biochimiques et immunochimiques développées pour le dosage de l'haptoglobine chez les bovins.  | 33  |
| Tableau 4 : sites extra-hépatiques de synthèse de la A-SAA et de l' $\alpha_1$ -AGP.....  | 51  |
| Tableau 5 :Régulation de la synthèse hépatique des différentes protéines de la phase aiguë par les cytokines IL-6 ; IL-1 $\beta$ et TNF $\alpha$ chez l'homme                         | 53  |
| Tableau 6 : valeur usuelles de la formule sanguine chez les bovins adultes  | 65  |
| Tableau 7 : variation des paramètres hématologiques selon l'âge chez des vaches Prim'holstein saines.   | 66  |
| Tableau 8 : caractéristiques des différentes neutrophilies  | 68  |
| Tableau 9 : Valeurs usuelles des principales protéines de la phase aiguë chez des bovins sains.   | 70  |
| Tableau 10 : moyenne, écart-type, et intervalle des valeurs des protéines du LCR de 16 bovins adultes   | 76  |
| Tableau 11 : moyenne, écart-type et intervalle des composantes cellulaires du LCR des adultes.  | 76  |
| Tableau 12 : CCS moyen suivant l'âge et le statut infectieux des vaches   | 77  |
| Tableau 13 : Comptage de cellules somatiques suivant le stade de lactation et le statut infectieux des vaches   | 80  |
| Tableau 14 : caractéristiques macroscopiques et cytologiques du liquide péritonéal normal, d'après [9, 147]).   | 81  |
| Tableau 15 : caractéristiques cinétiques des principales PPA chez les bovins  | 94  |
| Tableau 16 : performances statistiques intrinsèques de cinq PPA et de la vitesse de sédimentation pour le dépistage d'un syndrome inflammatoire chez l'homme.                         | 108 |
| Tableau 17 : sensibilité, spécificité, VPP et VPN des marqueurs sanguins pour la mise en évidence d'un processus inflammatoire chez les bovins.....                                   | 109 |
| Tableau 18 : sensibilité, spécificité, VPP et VPN de la SAA, et l'Hp mesurées dans le lait, utilisées comme marqueurs de l'inflammation mammaire (mammites cliniques) chez les bovins | 114 |
| Tableau 19 : Sensibilité et spécificité, des paramètres cellulaires du lait utilisés pour la mise   |     |

|  |     |
|--|-----|
| en évidence d'une inflammation mammaire subclinique chez les bovins. ....  | 115 |
| Tableau 20 : sensibilité, spécificité des paramètres du liquide de ponction abdominale pour la mise en évidence d'une inflammation du péritoine chez les bovins. ....                        | 117 |
| Tableau 21 : Sensibilité, spécificité, pouvoir discriminant du dosage des PPA et des paramètres hématologiques pour différencier les inflammations aiguës des inflammations chroniques ..... | 119 |
| Tableau 22 : Données fournies par l'analyse du LCR dans diverses atteintes du système nerveux central chez les bovins et les ovins .....   | 131 |

## INTRODUCTION

La réaction inflammatoire est une réponse non spécifique de l'organisme aux destructions cellulaires provoquées par des agents physiques, chimiques ou biologiques ou d'origine immune ou tumorale. Elle est caractérisée par des événements locaux et systémiques visant à en identifier, contenir et éliminer la cause et à restaurer l'intégrité tissulaire et l'homéostasie. La réaction inflammatoire est normalement transitoire quand l'évolution se fait rapidement vers la guérison mais peut s'exprimer de façon persistante lors d'affections chroniques.

Pour le clinicien, la mise en évidence et la caractérisation d'un foyer inflammatoire sont d'un grand intérêt en terme de diagnostic. Cependant, le caractère limité des informations fournies par l'examen clinique, la faible spécificité des symptômes, et l'expression parfois sub-clinique de la réaction inflammatoire, rendent souvent nécessaire le recours aux examens complémentaires.

La connaissance des marqueurs de l'inflammation est ancienne. En 1894, Edmund Biernacki décrit pour la première fois de manière scientifique l'augmentation de la vitesse de sédimentation chez des patients atteints de maladies infectieuses et d'arthrite rhumatoïde. La première description de l'augmentation de la fibrinogénémie chez l'animal par Von den Velden date de 1914. En médecine humaine, l'évaluation des marqueurs de l'inflammation est désormais une pratique usuelle. En revanche, chez les bovins, les connaissances dans ce domaine sont encore limitées.

Dans la première partie de cette étude bibliographique, seront présentés les principaux marqueurs de l'inflammation et leurs méthodes d'exploration. Les différents paramètres du sang, du Liquide Céphalo-Rachidien (LCR), du lait et du liquide péritonéal ont été choisis en raison de leurs implications cliniques respectives. Dans une seconde partie, nous exposerons les mécanismes physiopathologiques à l'origine des modifications de ces marqueurs. Ces connaissances sont en effet nécessaires pour en envisager les applications cliniques. Celles-ci seront abordées dans une troisième et dernière partie où sera évaluée la fiabilité des différents marqueurs proposés ainsi que leur intérêt dans le diagnostic différentiel.

## **PREMIÈRE PARTIE**

### **NATURE, FONCTIONS, ET METHODES D'ANALYSE DES MARQUEURS DE L'INFLAMMATION**

La réaction inflammatoire locale se caractérise par une vasodilatation capillaire immédiate suivie, dans les quinze minutes à une heure, d'une stase sanguine favorisant l'exsudation plasmatique et la formation d'un œdème. L'activation des cellules endothéliales des vaisseaux lésés permet, dès la quatrième heure, la diapédèse des polynucléaires neutrophiles qui exercent une activité phagocytaire intense au sein du foyer de cytolysse. Ultérieurement, les cellules sanguines mononuclées et les macrophages tissulaires affluent sur le site de l'inflammation et assurent la détersion et le comblement de la plaie par un tissu de granulation. Ces événements sont à l'origine des quatre manifestations cliniques de caractéristique de l'inflammation : tuméfaction, douleur, rougeur, chaleur.

La réaction inflammatoire systémique se traduit par de nombreuses modifications de l'homéostasie. Il s'agit principalement (i) de l'activation de la cascade du complément et de la coagulation, (ii) de l'apparition d'un syndrome fébrile et d'anorexie, (iii) de modifications du métabolisme lipidique, (iv) d'une augmentation de la néoglucogénèse et du catabolisme protéique, (v) de modifications hormonales, (vi) de variations des concentrations plasmatiques en oligo-éléments et vitamines, (vii) d'une leucocytose et (viii) de variations des concentrations de certaines protéines plasmatiques appelées protéines de la phase aiguë.

Ces différentes modifications locales et systémiques peuvent être exploitées à des fins diagnostiques et servir de marqueur biologique de la présence et de l'activité d'une réaction inflammatoire. Cependant, pour être exploitables d'un point de vue clinique, ces marqueurs doivent répondre à différents critères :

- avoir une variation significative par rapport aux valeurs de base afin que les résultats des examens complémentaires puissent être interprétés sans ambiguïté ;
- dépendre uniquement de la réaction inflammatoire : les variations physiologiques ou dues à des facteurs indépendants du syndrome inflammatoire doivent être nulles à minimales.
- avoir une dépendance stricte de la réaction inflammatoire : les valeurs mesurées doivent être proportionnelles au degré d'atteinte tissulaire.
- avoir une cinétique rapide, afin que les variations des marqueurs suivent au plus près celles de l'inflammation.

- leur analyse/dosage doivent être rapide et peu coûteux.

Cette première partie propose de présenter les différents paramètres biologiques répondant à ces critères chez les bovins.

Une augmentation de la cuprémie ainsi qu'une diminution de la zincémie et de la férémie sont classiquement associées à la réaction inflammatoire aiguë ou chronique [52, 75, 93, 154]. Ces modifications sont cependant difficilement appréciables sur le terrain chez les bovins. En effet, les intervalles de valeurs usuelles sont mal connus, et les variations alimentaires souvent importantes limitent leur interprétation. Ces paramètres sont donc peu utilisables comme marqueurs de l'inflammation et ne seront pas étudiés dans la suite de ce travail.

## **I - PARAMETRES HEMATOLOGIQUES**

### **I.1 - DEFINITION**

Parmi les différents paramètres hématologiques, le leucogramme est le paramètre le plus approprié pour évaluer l'existence d'une inflammation. Il comprend le nombre de leucocytes totaux, de neutrophiles segmentés et non segmentés, de monocytes, d'éosinophiles et de monocytes.

La vitesse de sédimentation ne semble pas être un marqueur intéressant chez les bovins. En effet, les valeurs observées physiologiquement sont très élevées et les variations dues à l'inflammation sont trop peu importantes [25, 170].

La teneur en d'hémoglobine est variablement affecté lors d'inflammation. Lors d'affection chronique, une anémie hypochrome macrocytaire peu être observée [17, 37, 38, 220, 221]. Cependant, en raison de sa faible sensibilité et de sa faible spécificité, ce paramètre n'est pas utilisé comme marqueur de l'inflammation chez les bovins.

### **I.2 - METHODES D'ANALYSE**

La numération formule sanguine est réalisée de façon automatisée à l'aide de compte

globules. La réalisation de frottis permet d'apprécier la morphologie et la richesse relative de chaque population leucocytaire.

Les fonctions des cellules de l'inflammation ne seront pas revues ici. Elles sont détaillées par ailleurs [169].

## **II - PROTEINES DE LA PHASE AIGÜE**

### **II.1 - DEFINITION**

Les protéines de la phase aiguë (PPA) ou protéines de la réaction inflammatoire (PRI) sont un ensemble de glycoprotéines qui répondent à la définition retenue par la Société Française de Biologie Clinique : " les protéines de l'inflammation sont des protéines plasmatiques, dont le taux de production hépatique est supérieur au taux de catabolisme, au cours de la réaction inflammatoire, quelle que soit la cause de cette dernière".

#### **II.1.1 - Classification**

Deux groupes de protéines de la phase aiguë sont définis : les "protéines positives", dont la concentration plasmatique augmente lors de inflammation et les "protéines négatives" dont la concentration diminue.

Les protéines positives sont elles-même subdivisées en 3 groupes en fonction de leur degré d'augmentation :

- groupe I ou PPA mineures : augmentation du taux plasmatique d'un facteur inférieur à deux.
- groupe II ou PPA modérée : augmentation d'un facteur 2 à 10.
- groupe III ou PPA majeures : augmentation d'un facteur 10 à 1000.

Une vingtaine de PPA ont été décrites chez l'homme. Les principales, ainsi que leur synonymes et abréviations sont regroupés dans le tableau 1 en fonction de leur appartenance

aux groupes définis ci-dessus.

Tableau 1 : principales protéines de la phase aiguë chez l'homme [81, 96, 155].

|                          |                     |   |   |   |
|--------------------------|---------------------|---|---|---|
|                          | Pas de modification | $\alpha_2$ -Macroglobuline ( $\alpha_2$ -M)<br>Hemopexine (Hx)<br>Protéine Sérique Amyloïde P (SAP) |   |   |
| <b>PPA<br/>NEGATIVES</b> | Diminution          | Albumine (Alb)<br>Préalbumine (Pré-Alb)<br>Transferrine (Tf)<br>Fibronectine (Fb)                   |   |   |
|                          |                     | Groupe I<br>Augmentation $\leq 2$ fois  | Céruleoplasmine ou Céruloplasmine (Cp)<br>Composant C3 et C4 du complément (C3, C4)<br>$\alpha_1$ - Antiplasmine ( $\alpha_1$ -AP)<br>$\alpha_1$ -Protéase Inhibiteur ( $\alpha_1$ -PI, PI) ou $\alpha_1$ -Antitrypsine ( $\alpha_1$ -AT, AT) |   |
|                          |                     |   | Groupe II<br>Augmentation 2 à 10 fois   | $\alpha_1$ -Antichymotrypsine ( $\alpha_1$ -ACT, ACT)<br>$\alpha_1$ -Glycoprotéine Acide ( $\alpha_1$ -AGP, AGP) ou orosomucoïde<br>Haptoglobine (Hp)<br>Fibrinogène (Fb)<br>Lipopolysaccharide Binding protein (LBP) |
|                          |                     |   |   | Groupe III<br>Augmentation 10 à 1000 fois   |

### II.1.2 - Différences inter-espèces (tableau 2)

Les protéines de la phase aiguë ont été identifiées chez de nombreuses espèces animales, particulièrement chez les animaux de laboratoire (souris, rat, lapin, hamster). Les PPA du chien, du chat [61, 66, 101, 134, 184, 251] et du cheval [120, 194] ont fait l'objet de nombreuses études ces dernières années et ont des caractéristiques voisines des PPA humaines. De même, les caractéristiques des PPA porcines ont été récemment établies [68,

**149]** Dans cette espèce, une nouvelle protéine de la phase aiguë a été décrite, la **MAP** (major acute phase protéine), qui s'apparente à la kallikreine PK-120 humaine **[103]**.

Chez les ruminants, les PPA bovines ont été largement étudiées et caractérisées **[60, 92, 142]**. Les données concernant les ovins et les caprins restent limitées.

Les variations inter-espèces sont résumées dans le Tableau 2.

En ce qui concerne les bovins retenons que :

- contrairement à la plupart des autres espèces monogastriques exceptée la souris, la **CRP** et la **SAP** ne semblent pas avoir le profil de PPA **[162]**. En outre, leur concentration évolue en fonction de la lactation chez la vache laitière **[79, 171, 174]**.
- deux molécules peuvent être classées dans le groupe des PPA majeures (groupe III) : la **SAA**, dont la concentration augmente d'un facteur 100 à 1000, et l'**haptoglobine**, dont la concentration augmente d'un facteur 100, contrairement à ce qui est observé chez beaucoup d'autres mammifères (homme, chat, chien, cheval, porc...)
- les autres PPA présentant un intérêt chez les bovins sont les suivantes : l' **$\alpha_1$ -AGP**, l' **$\alpha_1$ -PI**, le **fibrinogène** et la l' **$\alpha_1$ -Antitrypsine**.
- Une nouvelle PPA a été décrite récemment chez les bovins **[224]** : la **LBP** (Lipopolysaccharide Binding Protein), déjà connue chez l'homme **[225]**. Elle évoluerait de façon semblable à l'haptoglobine bovine, avec cependant une cinétique plus rapide.
- Parmi ces PPA, les plus étudiées et les mieux connues chez les bovins sont : l'**haptoglobine**, la **SAA** et l' **$\alpha_1$ -AGP** dans le sérum et l' **$\alpha_1$ -PI** dans le lait.

Tableau 2 : variabilité des profils de synthèse des PPA chez les mammifères. 0, pas de modification de la concentration ; – , diminution ; +, augmentation jusqu'à un facteur 2 ; ++ augmentation d'un facteur 2-10 ; +++ , augmentation jusqu'à un facteur 100 ; ++++ augmentation > 100 fois (par rapport aux valeurs de départ). (d'après [103, 134, 155]).

| Espèce  | CRP      | SAA         | SAP          | $\alpha_1$ -AGP | $\alpha_2$ M | Hp         | $\alpha_1$ -PI | Cp       | Fb          | Alb      |
|---------|----------|-------------|--------------|-----------------|--------------|------------|----------------|----------|-------------|----------|
| Homme   | ++++     | ++++        | 0            | ++              | 0            | ++         | +              | +        | ++          | –        |
| Rat     | ++       |             | 0            | +++             | ++++         | ++         |                |          | ++          | –        |
| Souris  | 0        | ++++        | +++          | ++              |              | +          | 0              |          | ++          | –        |
| Hamster | +        | +++         | +++          |                 | +            |            | -              |          |             | –        |
| Lapin   | ++++     | ++          |              | +++             | ++           | ++         | ++             | ++       | +++         | –        |
| Equin   | ++       | +++         |              | ++              | +            | ++         |                | +        |             | –        |
| Porcin  | ++(+)    | +++         |              | 0 (+)           |              | ++         | +              | +        |             | –        |
| Caprin  | +        |             |              |                 | +            | ++++       |                |          | ++          | –        |
| Ovin    |          | ++          |              | ++              | +            | ++++       | ++             | ++       | ++          | –        |
| Bovin   | <b>0</b> | <b>++++</b> | <b>0 (+)</b> | <b>++</b>       | <b>+</b>     | <b>+++</b> | <b>++</b>      | <b>+</b> | <b>+(+)</b> | <b>–</b> |
| Canin   | +++      | +++         |              | +++             |              | +          | 0              | +        | ++          | –        |
| Félin   | ++(?)    | +++         |              | +++             |              | ++         |                |          |             | –        |

## II.2 - NATURE ET PROPRIETES BIOCHIMIQUES DES PROTEINES DE LA PHASE AIGUË CHEZ LES BOVINS

Les différentes protéines de la phase aiguë ont été regroupées sous les termes de glycoprotéines solubles, en raison de leur grande hydrosolubilité [160, 178]. En électrophorèse, elles migrent en position  $\alpha$  ou  $\beta$ .

### a) L'haptoglobine

L'haptoglobine est composée de 2 chaînes polypeptidiques ( $\alpha$  et  $\beta$ ), reliées entre elles par une liaison disulfure. Chez l'homme, trois phénotypes sont décrits, Hp(1-1), Hp(2-2) et Hp(2-1). Ce polymorphisme est dû à l'existence de deux types de chaîne  $\alpha$ , la forme  $\alpha_1$  (8.9 kDa) et la forme  $\alpha_2$  (16 kDa), et aux différentes associations possibles entre les chaînes [270]. La chaîne  $\beta$  (40 kDa) est commune aux trois phénotypes. L'Hp(1-1) est un tétramère composé de deux dimères  $\alpha_1$ - $\beta$ . L'Hp(2-2) est un polymères de  $\alpha_2$ - $\beta$ . L'Hp(2-1) consiste en une chaîne polymérique de dimères  $\alpha_2$ - $\beta$  flanquée d'une unité  $\alpha_1$ - $\beta$  de chaque côté (figure 1). Ce polymorphisme de structure explique la différence des poids moléculaires : Hp(1-1) : 86 kDa ; Hp(2-1) : 86-300 kDa et Hp(2-2) : 170-900 kDa)

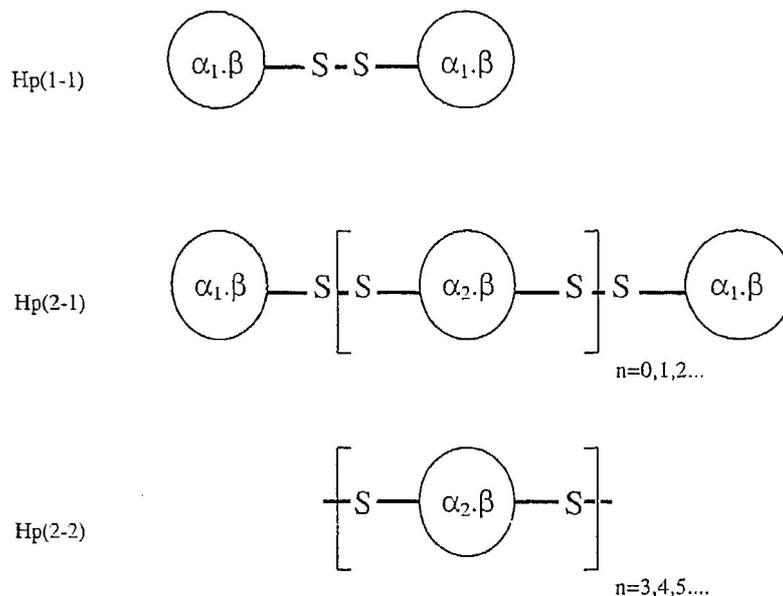


Figure 1 : structure de l'haptoglobine, d'après[270].

L'haptoglobine bovine est structurellement proche de l'Hp(2-2) humaine avec cependant quelques différences.

Les chaînes  $\alpha$  (16 kDa) et  $\beta$  (40 kDa) ont des poids moléculaires comparables aux chaînes  $\alpha_2$  et  $\beta$  décrites chez l'homme [63, 159].

En électrophorèse, l'Hp bovine migre en  $\beta$ , contrairement à la position  $\alpha_2$  de l'Hp humaine. Son poids moléculaire est supérieur à l'Hp (2-2) : entre 200 et 2000 kDa [159].

L'analyse en SDS-PAGE d'haptoglobine bovine purifiée montre l'existence d'une bande supplémentaire à 67 kDa, correspondant au poids moléculaire de l'albumine bovine, ce qui suggère que l'haptoglobine bovine est associée de façon physiologique à l'albumine. Cette association se ferait par une liaison covalente bisulfure, et expliquerait en partie le poids moléculaire élevé [63].

Une étude utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre l'Hp(2-2) humaine montre l'existence d'une homologie antigénique partielle entre l'Hp bovine et l'Hp(2-2) humaine [139].

Un seul phénotype a pour l'instant été décrit chez les bovins.

#### b) SAA

Le terme SAA regroupe un ensemble d'apolipoprotéines de poids moléculaire entre 14 et 17 kDa et de structure très semblable chez toutes les espèces dans lesquelles elles ont été mises en évidence (mammifères, poisson, reptiles... et même bactéries). Quatre molécules, SAA1, SAA2, SAA3 et SAA4, codées par 4 gènes distincts ont été décrites (revue dans [265]). Les protéines SAA1 et SAA2 (respectivement 104 et 103 acides aminés) sont dites inductibles (A-SAA), car leur synthèse hépatique est fortement augmentée lors d'inflammation. La SAA4 est une protéine constitutive (C-SAA), associée aux HDL de façon physiologique. Le gène SAA3 est considéré comme un pseudogène. Cependant la protéine SAA3 a été récemment mise en évidence dans le colostrum de la vache [163].

La SAA bovine, comporte aussi plusieurs isoformes, de poids moléculaire 12.5 à 14 kDa [2, 121]. L'utilisation d'anticorps monoclonaux anti SAA humaine a montré l'existence d'une forte réaction croisée avec la SAA bovine [117].

#### c) $\alpha_1$ -AGP

L' $\alpha_1$ -AGP est une glycoprotéine de 31 à 40 000 kDa, fortement glycosylée (45 % du

poids est représenté par les radicaux glycosylés). Elle consiste en une chaîne polypeptidique unique de 183 acides aminés, flanquée de 2 à 4 branches de radicaux glycosylés (revue dans [78]). La composition de l' $\alpha_1$ -AGP bovine en acides aminés a été décrite [123, 255].

### **II.3 - FONCTIONS DES PROTEINES DE LA PHASE AIGUË**

Plusieurs auteurs ont tenté de classer les différentes protéines de la phase aiguë selon leur(s) fonction(s) biologique(s) principale(s). Certaines d'entre elles, comme la SAA et l' $\alpha_1$ -AGP, demeurent encore incomplètement connues.

#### **II.3.1 - Fonctions antiprotéasiques des PPA**

Parmi les différentes familles d'inhibiteurs des protéases connues chez les mammifères, trois ont un comportement de protéine de la phase aiguë. Les inhibiteurs des sérine-protéases (ou *serpines*) dont l' $\alpha_1$ -Protease Inhibitor, et l' $\alpha_1$ -Antichymotrypsine et l' $\alpha_1$ -Antiplasmine ; les inhibiteurs de thiol-protéases (groupe des  $\alpha_2$ -macroglubulines) et les protéines de la famille de la cystatine. Selon les espèces concernées, toutes ne sont pas des PPA: chez les bovins, seules l' $\alpha_1$ -Protease Inhibitor, l' $\alpha_1$ -Antichymotrypsine et l' $\alpha_2$ -macroglubuline sont considérées comme telles.

Dans les conditions physiologiques, ces molécules régulent le turnover des protéines de la matrice extracellulaire, la fibrinolyse, la coagulation et l'activation de la cascade du complément. Lors de la réaction inflammatoire, elles inactivent les enzymes protéolytiques circulantes d'origine étrangère (bactéries, parasites) ou libérées par la dégranulation des leucocytes (élastase, cathepsine G...) et la lyse cellulaire (protéases acides, thiol-protéases, sérine-protéases et métalloprotéases ) [96]. Deux interactions sont en fait possibles entre les protéases et les *serpines* (groupes des *sérine-protease inhibitors*) [155]. Ces inhibiteurs de protéases sont relativement spécifiques de certaines enzymes et sont par ailleurs très sensibles à l'action protéolytique des protéases sur lesquelles elles n'agissent pas. Une liaison spécifique (entre l' $\alpha_1$ -PI et l'élastase par exemple) conduit à la formation d'un complexe stable entre les deux molécules, à la destruction de l'enzyme cible puis à sa phagocytose. Lors d'une liaison non spécifique, la *serpin* est clivée par sa cible. Elle peut alors avoir, comme c'est le cas pour l' $\alpha_1$ -PI, des propriétés chimiotactiques pour les neutrophiles, ou stimuler sa propre synthèse par les monocytes/macrophages.

L' $\alpha_1$ -Antichymotrypsine a de plus la capacité d'inhiber la formation d'ions superoxydes ; il a par ailleurs été démontré que l' $\alpha_1$ -PI neutralisait la cytotoxicité des lymphocytes Natural Killer [96].

### **II.3.2 - Fonctions épuratrices et antioxydantes des PPA**

L'**haptoglobine** a la capacité de fixer l'hémoglobine libre et ses dérivés (cyanhémoglobine en particulier), issus de la lyse des globules rouges lors de leur apoptose ou lors d'hémolyse [21, 259, 270]. Le complexe Hp-Hb ainsi formé, de taille trop importante pour être filtré par les glomérules rénaux, est catabolisé par le foie ou les macrophages, permettant le recyclage du fer de l'hème.

L'activité antioxydante de l'haptoglobine est indirecte. La formation du complexe Hp-Hb, en capturant le fer de l'hème, limite la formation de radicaux libres  $\text{OH}^\cdot$ , selon la réaction de Fenton :  $\text{Fe(II)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^\cdot + \text{OH}^- + \text{Fe(III)}$ . Ces radicaux libres, hautement oxydants, sont à l'origine de dommages irréversibles des endothéliums vasculaires et de l'oxydation des lipides (LDL). L'haptoglobine possède aussi la capacité de stimuler l'angiogenèse, en activant la croissance et la différenciation des cellules endothéliales, et participe de ce fait à la cicatrisation [81]. En inhibant la production de prostaglandines, elle réduit l'aggrégation plaquettaire [35, 155]. Murata et Miyamoto (1993) [177] ont mis en évidence une activité immunodépressive de l'haptoglobine chez des veaux exposés au stress de transport. Sa mise en évidence au sein des HDL (High Density Lipoproteins), des VLDL (Very High density Lipoproteins) et des chylomicrons (0.2 à 0.3 % de la concentration sérique totale en haptoglobine) suggère une intervention dans le métabolisme des lipides [136, 140, 285].

La **céruloplasmine** est un inhibiteur des agents oxydants, tels le peroxyde d'hydrogène  $\text{OH}^\cdot$  et les ions superoxydes  $^\circ\text{O}_2^-$ , formés au cours de la réaction inflammatoire et libérés par les phagocytes. A cette puissante activité antioxydante s'ajoute la capacité de fixer le cuivre, réduisant la fraction libre disponible pour le métabolisme et la multiplication bactérienne et permettant son transport pour la synthèse de différentes co-enzymes cuivre dépendantes comme la cytochrome-oxydase [74, 96, 155].

Les propriétés de la **SAA** ne sont encore que partiellement connues (revues dans [200, 265]). Dans un contexte inflammatoire, la SAA est retrouvée en grande quantité liée à la fraction libre des HDL<sub>3</sub> inflammatoires, au détriment de l'apoprotéine ApoA<sub>1</sub> [286]. Cette

liaison conduit à des modifications du métabolisme des HDL et du transport du cholestérol. Ainsi, l'inversion du rapport ApoA<sub>1</sub>/SAA au sein des HDL<sub>3</sub> réduit de façon dramatique l'activité de la Lecithin Cholestérol Acyl Transférase (LCAT), enzyme responsable de l'estérification du cholestérol. De même les HDL sont 2 à 3 fois plus sensibles à l'action de la phospholipase A2 (sPLA<sub>2</sub>) quand ils sont associés à la SAA. Deux hypothèses principales sont émises quant à la signification de ces modifications : selon la première, la SAA, associée aux HDL, favorise la fourniture de lipides, en particulier de cholestérol, aux cellules dont les besoins sont augmentés pour la reconstruction tissulaire au sein du foyer inflammatoire. Selon l'autre hypothèse, la SAA faciliterait la phagocytose par les macrophages du cholestérol issu de la lyse cellulaire et son recyclage ultérieur par le foie [74, 200, 265].

La clairance rapide de la SAA en fait un épurateur efficace de ces déchets cellulaires, ainsi que des endotoxines lipopolysaccharidiques bactériennes. Il semblerait qu'elle ait aussi une action chimiotactique sur les cellules phagocytaires et lymphocytaires et induise et/ou facilite leur adhérence [81]. De multiples propriétés immunomodulatrices lui sont attribuées : diminution de la reconnaissance des antigènes par leur récepteurs spécifiques au niveau des lymphocytes ; réduction de l'activité des cellules Natural Killer, inhibition de la synthèse des prostaglandines E et de l'agrégation plaquettaire... [96].

### **II.3.3 - Fonction de restauration tissulaire des PPA**

La principale fonction du **fibrinogène** est sa participation à l'hémostase. En cas de lésion de l'endothélium vasculaire, le collagène est exposé au flux circulatoire. Les plaquettes se fixent sur ces fibres grâce à des récepteurs spécifiques. Ce phénomène s'accompagne d'une modification des récepteurs membranaires des thrombocytes pour le fibrinogène, permettant ainsi sa liaison. Il s'ensuit une agrégation rapide des plaquettes et la formation d'un caillot.

**L' $\alpha_1$ -AGP et l' $\alpha_1$ -ACT** sont aussi directement impliquées dans la restauration du tissu conjonctif : en se déposant à la surface des fibres élastiques néoformées elles les protègent des sérines-protéases présentes sur le site inflammatoire.

Le rôle précis de **l' $\alpha_1$ -AGP** au cours de la réaction inflammatoire reste inconnu [78]. Elle stimulerait la croissance des fibroblastes, agirait comme un cofacteur de l'héparine, maintiendrait la perméabilité capillaire et réduirait l'agrégation plaquettaire. Une forte action anti-inflammatoire et immunorégulatrice lui est aussi attribuée. En effet, *in vitro*, elle inhibe la

transformation lymphoblastique induite par la phytohématagglutinine [176], inhibe l'activation et le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles, stimule la sécrétion de l'IL-1 receptor antagonist (IL-1 RA), et module la synthèse des cytokines par les monocytes-macrophages [78].

#### **II.3.4 - Fonctions des protéines négatives de la phase aiguë**

Les concentrations en protéines totales (PT) diminuent sensiblement dans les premiers jours de la réaction inflammatoire, principalement en raison de la diminution de la synthèse hépatique d'albumine, PPA négative. Il semblerait que ceci soit la conséquence d'une orientation du métabolisme hépatocytaire vers une synthèse préférentielle de PPA positives, au détriment des PPA négatives. Ce phénomène permettrait de contrebalancer l'augmentation de la pression oncotique due aux protéines positives, et de fournir davantage d'acides aminés pour leur élaboration. Cependant Engler (1995) [74] fait remarquer que la plupart des PPA négatives sont des protéines de transport. La diminution de leur concentration plasmatique conduit à l'augmentation de la fraction libre, active, des ligands (vitamines, hormones, acides gras, oligo-éléments) qui jouent un rôle important dans la phase de restauration cellulaire.

#### **II.4 - DOSAGE DES MARQUEURS PROTEIQUES**

Les techniques de dosage des protéines de la phase aiguë ont d'abord été basées sur leur propriétés biochimiques, ce qui a l'avantage d'être applicable à toutes les espèces. Le développement d'anticorps mono- et/ou polyclonaux spécifiques depuis la fin des années 1980, a permis l'élaboration de techniques immunochimiques robustes et sensibles mais restreintes le plus souvent à l'espèce animale d'origine [65, 244].

Largement utilisées et commercialisées dans le domaine de la médecine humaine, ces techniques (biochimiques et immunochimiques) ne sont à l'heure actuelle disponibles en médecine vétérinaire que pour quelques-unes des protéines de la phase aiguë (Haptoglobine, SAA et  $\alpha_1$ -AGP) [60].

##### **II.4.1 - Protéines totales et globulines**

L'analyse réfractométrique est simple, rapide, et de coût très réduit. Sa précision est satisfaisante mais elle est moins sensible que de nombreuses techniques biochimiques (biuret,

Phénol-Folin-Ciocalteu, acide bicinchoninique, diverses méthodes de précipitation). Il existe une forte corrélation entre les résultats obtenus par réfractométrie et par la méthode du biuret. [83].

Le dosage de l'albumine sérique devrait toujours accompagner celui des protéines totales. La différence entre les deux valeurs correspond aux globulines, dont la majeure partie est composée par les gammaglobulines. La synthèse de l'albumine varie en association associées avec l'inflammation chronique et d'autres affections (voir page 81).

L'analyse quantitative des différentes fractions des protéines totales fait appel à des méthodes turbidimétriques (précipitation indépendante des diverses globulines par différents sels, chlorure de sodium, chlorure d'ammonium, sulfate de zinc, de sodium et d'ammonium) ou à l'électrophorèse (acétate de cellulose, gel d'agarose, gel polyacrylamide (PAGE)...). Ces dernières techniques ont été mises à profit pour isoler et analyser les protéines de la phase aiguë. Cependant elles ne sont pas applicables en dehors des laboratoires spécialisés.

Jain (1993) [126] rapporte une technique simple pour détecter les hypergammaglobulinémies :

1- Mélanger 2.5 ml d'une solution à 1.2 % de glutaraldéhyde additionnée de Na<sub>2</sub>EDTA à raison de 1mg/ml à une quantité équivalente de sang frais.

2- après 15 minutes à température ambiante, le sang contenant une forte concentration de gammaglobulines coagule, tandis que le sang normal reste fluide.

Cette méthode doit cependant être étalonnée, en raison des grandes variations observées suivant les solutions de glutaraldéhyde utilisées.

#### **II.4.2 - Dosage de l'haptoglobine**

##### a) Spectrophotométrie différentielle

L'addition du sérum à analyser à une quantité connue d'hémoglobine en milieu acide, suivie de l'analyse spectrophotométrique de l'absorbance du complexe Hp-Hb comparée à celle de l'Hb seule, a été mise à profit par Elson (1974) [72] pour développer une technique simple quoique laborieuse et peu rapide.

La sensibilité d'une telle technique est de 40 mg Hp/L. L'analyse d'échantillons hémolysés est impossible [217].

b) Méthodes biochimiques

• **Mesure de l'activité peroxydasique de l'hémoglobine**

Ces différentes techniques reposent sur le fait que l'activité peroxydasique de l'hémoglobine ou des des dérivés (méthémoglobine ou cyanméthémoglobine) est conservée en milieu acide par la formation du complexe Hp-Hb.

La concentration en haptoglobine de l'échantillon est proportionnelle à l'activité peroxydasique d'une solution d'hémoglobine de concentration connue à laquelle on ajoute une quantité déterminée de sérum à analyser.

L'unité de mesure est la quantité d'Hb liée par l'Hp pour 100 ml de sérum (mg HbBC/100ml) (BC= binding capacity). La conversion en gramme par litre peut se faire sachant que 1 g/l = 29 mg% HbBC.

Nous décrivons ici brièvement la technique de Makimura et Suzuki (1982) [159] qui reste à l'heure actuelle une référence très utilisée.

Dans un premier tube, 0.1 ml d'une solution à 30 mg/100 ml d'hémoglobine (obtenue par la lyse de globules rouges dans de l'eau distillée et du toluène) est mélangé à 0.02ml de sérum à analyser. Un volume de 0.02 ml de cette solution est transféré dans un deuxième tube contenant 5 ml d'une préparation d'o-dianisidine (0.6 pour mille, pH=4.1). Après incubation à 37°C pendant 45 minutes- temps nécessaire à l'inactivation complète de l'hémoglobine libre - l'addition de 0.05 ml de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 200 mM sert de révélateur colorimétrique. La mesure de l'intensité de cette couleur est réalisée au spectrophotomètre à 440 nm. Une mesure est aussi faite sur un témoin négatif (mélange des réactifs sans le sérum).

La concentration en haptoglobine de l'échantillon est déduite d'une courbe standard d'absorbance élaborée en incubant différentes quantités connues d'hémoglobine avec un sérum standard contenant une grande quantité d'haptoglobine (>150 mg/100 ml, sérum de vache atteinte de mammites aiguës à *E. coli*).

Owen *et al.* (1960) [190] et Conner *et al.* (1988) [41] utilisent le même procédé mais

remplacent respectivement l'o-Dianisidine par du guaiacol (pH=4, lecture à 492 nm) et du tétra-méthylbenzidine (pH=3.8, lecture à 370 nm).

Les principaux inconvénients de ces techniques sont les suivants :

- manipulation de réactifs dangereux ou toxiques (o-Dianisidine et guaiacol) ou très sensibles à la peroxydation, nécessitant la dilution plusieurs centaines de fois de l'échantillon à traiter (tétra-méthylbenzidine).
- techniques manuelles, échantillon par échantillon, et donc très longue.
- résultats faussés en cas d'hémolyse importante de l'échantillon (si Hb libre >1,5 g/l pour la méthode de Makimura et Suzuki), et par la présence de cystéine et de glutathion peroxydase dans le sérum [172].

Ces techniques ont été améliorées afin de permettre la lecture de plusieurs échantillons à la fois [133] et le traitement de plusieurs centaines de sérums par jour est désormais possible grâce à l'automatisation et la robotisation de l'analyse [64, 67, 246, 247].

La liaison de l'albumine avec l'haptoglobine dans le sérum [63, 173] fausser les résultats lorsque la concentration en Hp est faible comme c'est le cas chez les bovins [67, 133].

Le développement d'une technique robuste qui prend en compte cette donnée est à la base du premier kit de dosage biochimique de l'haptoglobine commercialisé, applicable à de nombreuses espèces et utilisable pour une mesure manuelle ou automatisée [67, 133] (Tridelta Development ldt, Eire, Ireland). La limite inférieure de détection est de 50 mg/l. L'hémolyse peut fausser les résultats quand la concentration en Hp est comprise entre 40 mg/l et 1.8 g/l. De plus, cette méthode ne s'est pas révélée efficace dans la détection de l'haptoglobine dans le lait, en raison de l'activité peroxydasique de la lactoperoxydase [69].

- **HPLC (High performance liquid chromatography) [217]**

Cette technique consiste à ajouter à l'échantillon de sérum à analyser de la cyanméthémoglobine en excès et à séparer le complexe Hp-HbCN de l'hémoglobine libre par chromatographie. Cette méthode nécessite la dépolymérisation de l'haptoglobine du sérum par une solution à 100 mM de 2-mercaptoéthanol. La lecture de l'absorbance au spectrophotomètre à 398 nm permet d'observer la migration du complexe Hp-HbCN et de

l'hémoglobine libre. La concentration en haptoglobine est déduite de la mesure de l'aire sous la courbe de migration et d'une courbe de concentration standard établie à partir de différentes dilutions d'un sérum humain standard.

Selon les auteurs, le seuil de détection cette méthode est de 5 mg/l d'haptoglobine. La durée d'analyse est d'environ 20 minutes.

L'hémolyse des échantillons n'affecterait pas les résultats.

- **Electrophorèse capillaire**

Récemment développée par Pirlot *et al.* (1999) [199], cette technique, comme l'HPLC, est basée sur la différence de vitesse de migration du complexe Hp-Hb et de l'hémoglobine libre. Le support utilisé ici sont des tubes capillaires - où sont mis en contact le sérum et une solution d'hémoglobine de concentration connue - soumis à une électrophorèse. La mesure de l'absorbance à 415 nm révèle les tracés de migration de l'hémoglobine libre et du complexe Hp-Hb. La concentration en haptoglobine est déduite du calcul de la quantité d'hémoglobine liée en mesurant l'aire sous la courbe.

La meilleure séparation entre le complexe Hp-Hb et l'hémoglobine libre est obtenue, pour les bovins, en utilisant de l'hémoglobine canine.

Les principaux avantages de cette technique sont sa rapidité (10 minutes par échantillon) et son faible coût (1 ou 2 euros par échantillon). Le seuil de détection initialement estimé à 220 mg/l, [199], a été abaissé à 20 mg/l [7].

c) Techniques immunochimiques

- **Immunodiffusion radiale simple de Mancini (SRID) en gel d'agarose.**

Ces techniques utilisent des sérums polyclonaux anti-Hp bovine développés chez le lapin [172, 173], chez le mouton [60] ou chez le cheval [95], incorporés aux plaques d'agarose.

La mesure des diamètres des anneaux de précipitation formés par le complexe Hp-AcAntiHp est réalisée après 48h d'incubation à température ambiante ou à 37°C en boîte humide, selon les auteurs. La concentration en haptoglobine est obtenue par référence à une

gamme étalon (haptoglobine purifiée ou sérum standard).

La sensibilité et la précision de la lecture sont augmentées de manière significative après dépolymérisation de l'haptoglobine due l'échantillon par une quantité équivalente d'une solution contenant 20 mM de cystéine ou de glutathione [172].

Le seuil de détection de cette technique à été évaluée à 10 mg/l. L'hémolyse des échantillons ne pose pas de problème pour des concentrations en hémoglobine libre inférieures à 30g/l [172].

- **ELISA direct**

Les anticorps monoclonaux d'origine murine sélectionnés reconnaissent des épitopes de la molécule d'Hp différents du site de liaison de l'hémoglobine [236]. La détection de l'Hp est donc possible même en présence d'hémoglobine libre, rendant ces techniques insensibles à l'hémolyse. Les plaques sont sensibilisées avec les protéines sériques. La détection s'effectue à l'aide des anticorps monoclonaux. Des IgG de chèvre anti-souris, couplées à une enzyme à activité peroxydase (HRP) permettent la révélation colorimétrique.

Nakagawa *et al.* (1997) [179], utilisant des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la sous unité  $\beta$  de l'haptoglobine, et des Ac de chèvre anti-lapin couplés à la phosphatase alcaline, détectent des concentrations d'haptoglobine inférieures à 0.02 mg/l.

- **Two Sites EIA et Modified Two Sites EIA.**

Ces techniques utilisent l'affinité de l'Hp pour l'hémoglobine et le fait que les anticorps monoclonaux décrits ci-dessus se fixent sur un épitope de la molécule d'haptoglobine différent de celui que reconnaît l'hémoglobine.

**EIA** : les plaques sont sensibilisées à l'hémoglobine qui sert de molécule de capture pour l'haptoglobine. Les anticorps monoclonaux anti-Hp d'origine murine permettent la détection. Des IgG de chèvre anti-souris, conjugués à une enzyme à activité peroxydase (HRP) servent à la révélation colorimétrique [289].

**MTS-EIA** : les anticorps mono- et polyclonaux sont directement couplés à la phosphatase alcaline, ce qui élimine la phase d'incubation des plaques avec les anticorps anti-souris et raccourcit ainsi la procédure [216]. La sensibilité est augmentée. Une technique

similaire à été élaborée pour la détection de faibles concentrations d'haptoglobine humaine [138].

Le seuil de détection de telles techniques varie de 0.16 à 8 mg HbBC/100ml [216, 289].

Ces méthodes, basées sur la formation du complexe Hp-Hb, sont tributaires de la bonne qualité de conservation des échantillons et sont sensibles à l'hémolyse.

- **EIA en compétition [165, 166, 289]**

Les plaques ELISA sont sensibilisées à l'haptoglobine (concentration connue). L'addition de l'échantillon puis d'une solution d'anticorps monoclonaux anti-Hp de titre connu est ensuite réalisée. L'haptoglobine contenue dans l'échantillon rentre en compétition avec celle déjà présente sur les plaques vis à vis des anticorps monoclonaux.

Les concentrations en haptoglobine pouvant être détectées sont très faibles, de l'ordre de 0.01 mg/l, même en cas d'hémolyse du prélèvement.

- **ELISA indirect [89]**

Des anticorps monoclonaux dirigés contre la sous-unité  $\alpha$  de l'haptoglobine bovine servent à la sensibilisation des plaques et à la capture de l'haptoglobine de l'échantillon. La détection se fait à l'aide d'un second Ac monoclonal dirigé contre un autre épitope et conjugué à la biotine. La révélation colorimétrique se fait par une solution de streptavidine-HRP puis de streptavidine-phosphatase alcaline.

Le seuil de détection de cette technique est de 0.5 mg/l. L'hémolyse des prélèvements ne pose pas de problème puisque les Ac anti-Hp sélectionnés sont capables de reconnaître l'Hp même liée à l'hémoglobine.

Pour toutes les technique ELISA décrites ci-dessus, a lecture se fait par mesure de la densité optique de la réaction enzymatique à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration en haptoglobine est déduite d'une courbe standard établie à l'aide de sérums de référence ou de solutions d'haptoglobine purifiée.

Le tableau 3 regroupe les principales caractéristiques des différentes techniques développées pour le dosage de l'haptoglobine bovine.

Tableau 3 : techniques biochimiques et immunochimiques développées pour le dosage de l'haptoglobine chez les bovins.

### Méthodes biochimiques

| Méthode  | réactif principal | seuil détection | interaction avec l'hémolyse | automatisation | durée de l'analyse | Références                   |
|--|-------------------|-----------------|-----------------------------|----------------|--------------------|------------------------------|
| Mesure de l'activité peroxydasique             | O-dianisidine     | 70 mg/l         | Oui<br>si Hb >1,5g/l        | Non            | <1h                | <b>[159]</b>                 |
| Mesure de l'activité peroxydasique             | O-dianisidine     | 35 mg/l         | Oui                         | Oui            | >100<br>dosages /j | <b>[249]</b>                 |
| Mesure de l'activité peroxydasique             | guaïacol          | 0.1 à 0.2 g/l   | Oui                         | Oui            | >100<br>dosages/j  | <b>[133]</b><br><b>[246]</b> |
| HPLC   | mercapthoéthanol  | 5 mg/l          | Non                         | +/-            | 20 min             | <b>[217]</b>                 |
| Electrophorèse capillaire                      | -                 | 20 mg/l         | Non<br>si Hb<8 g/l          | +/-            | 10 min             | <b>[199]</b>                 |
| Mesure de l'activité peroxydasique (Tridelta®) | -                 | 50 mg/l         | Oui si 0.4 < Hp <1.8g/l     | Oui            | 5-10 min           | <b>[64]</b>                  |

### Méthodes immunochimiques

| Méthode            | Ac anti-Hp                                 | seuil détection | interaction avec hémolyse | automatisation | durée de l'analyse | Références   |
|--------------------|--|-----------------|---------------------------|----------------|--------------------|--------------|
| SRID               | Lapin + cystéine                           | 10 mg/l         | Non<br>(0.01-30 g/l)      | +/-            | 48h                | <b>[172]</b> |
| EIA en compétition | Monoclonal<br>(souris)                     | 0.01 mg/l       | Non                       | +/-            | 1.6 h              | <b>[165]</b> |
| ELISA              | monoclonaux Hap1<br>(souris)               | 5 mg HbBC%      | Non                       | +/-            | 5 h1/2             | <b>[236]</b> |
| ELISA              | polyclonaux anti $\beta$ –<br>Hp(lapin)    | 15.7 $\mu$ g/l  | Non                       | +/-            | ND                 | <b>[179]</b> |
| EIA                | Monoclonaux<br>Hap1 (Souris)               | 8 mg HbBC%      | Oui                       | +/-            | 5 h1/2             | <b>[289]</b> |
| MTS-EIA            | Monoclonal (souris)<br>Polyclonal (mouton) | 0.3 mg/l        | Oui                       | +/-            | 4h                 | <b>[216]</b> |
| Sandwich ELISA     | Monoclaux anti $\alpha$ -Hp<br>(lapin)     | 0.5 mg/l        | Non                       | +/-            | 4 h1/2             | <b>[89]</b>  |

### **I.1.1 - Dosage de la Sérum Amyloid A (SAA).**

La difficulté du dosage de la Sérum Amyloid A réside dans ses propriétés hydrophobes et sa liaison aux HDL<sub>3</sub>. Sa faible hydrosolubilité et son instabilité en solution tampon, compliquent l'élaboration de sérums étalons. La présence de lipides et de phospholipides rend certains épitopes de la molécule inaccessibles aux anticorps, biaisant les résultats obtenus à partir du sérum par rapport aux standards préparés en solutions tampons à l'aide de SAA purifiée.

Par conséquent, des dilutions d'un sérum riche en SAA dans un autre sérum pauvre en SAA sont utilisées pour étalonner les techniques [117, 284].

Ces étalons sont calibrés par densitométrie par rapport à des solutions de SAA purifiée, rendant possible l'expression des résultats en unité de masse par unité de volume [87].

De plus, la SAA est peu immunogène (du moins chez le lapin et la chèvre), rendant délicate la production d'antisérums à haut titre en anticorps.

Chez les bovins la principale technique développée est une ELISA indirecte [24, 117].

Dans la méthode décrite par Boosman (1989) [24], la réaction est dirigée contre la protéine amyloïde A (AA) et non contre la SAA elle-même. L'antisérum anti-AA est produit chez le lapin et purifié par double chromatographie. Des IgG de chèvre anti-lapin couplée à l'HRP permettent l'amplification.

En l'absence de sérum standard calibré, la concentration en SAA est exprimée en pourcentage de l'absorbance du témoin négatif moins celle du témoin négatif.

Horadagoda *et al.* (1993) [117] ont purifiée la SAA bovine et ont élaboré un sérum étalon calibré. Utilisant le fait que la SAA humaine réagit de façon croisée et spécifique avec la SAA bovine, les auteurs ont développé un ELISA indirect en utilisant un antisérum lapin Anti-SAA humaine et des IgG de singe anti-lapin conjuguées à l'HRP.

Le seuil de détection de la technique est de 3 mg/l.

Koets (1998) [145] décrit un autre ELISA indirect développé par Alsemgeest (1994) [4]

utilisant un antisérum polyclonal de lapin anti-SAA bovine comme premiers anticorps et des IgG de chèvre anti-lapin couplée à l'HRP. Le seuil de détection de 5 mg/l.

Un ELISA indirect [164] multi-espèces, applicable aux bovins [67, 69] a été mis sur le marché en 2000 (Tridelta Development Limited, Greystones, Ireland). Son seuil de détection est de 5 mg/l.

### **I.1.2 - Dosage de l' $\alpha_1$ -AGP.**

Les premières techniques ont fait appel à la précipitation du sérum par l'acide perchlorique puis phosphotungstique et lecture au spectrophotomètre [41]

Le dosage de l' $\alpha_1$ -AGP bovine est actuellement basé sur l'immunodiffusion radiale simple développée par Iwata *et al.* (1987) [123] ainsi que par Tamura *et al.* (1988) [255] suite à la production d'une solution étalonnée et d'anticorps polyclonaux chez le lapin.

Ces SRID, nécessitant de 24 à 48 heures de diffusion, permettent la détection de concentrations de 50 mg/l d' $\alpha_1$ -AGP.

Des kits de dosage sont commercialisés depuis quelques années (Bovine  $\alpha_1$ -AGPlate, Saikin Kagaku Institute, Sendai, Japan).

### **I.1.3 - Dosage de la céruloplasmine**

La concentration en Cp est estimée par l'activité oxydative du sérum sur le N,N-diméthyl-p-phénylénédiamine à un pH et une température où cette réaction est estimée maximale (généralement à 37°C et pH entre 5.5 et 6.5) [41]. Elle est exprimée en unité oxydase par millilitre, une unité correspondant à la quantité de céruloplasmine qui provoque une augmentation de l'absorbance à 550 nm de 0.01 par minute.

Cette technique n'est pas standardisée, rendant difficile la comparaison des résultats entre laboratoires.

Une immunodiffusion radiale simple basée sur un antisérum polyclonal de lapin a été développée par Guillou (1988) [95]. Les concentrations sont données en pourcentage de la réaction d'un sérum de référence.

#### **I.1.4 - Dosage de l' $\alpha_1$ -protéase inhibitor ( $\alpha_1$ -PI)**

Le dosage de  $\alpha_1$ -PI à partir du lait ou du plasma est basé sur la capacité de cette molécule à inactiver de façon dose dépendante l'activité de la trypsine [41, 115, 161]. La mesure se fait par lecture au spectrophotomètre à 405 nm de l'intensité du chromogène libéré par l'excès de trypsine (non activée par l' $\alpha_1$ -PI) en contact avec un substrat (N-benzoylarginine-p-nitroanilide). La technique est étalonnée avec un sérum ou surnageant standard de lait.

Des formes commerciales de ce test sont disponibles depuis 1985.

#### **I.1.5 - Dosage du fibrinogène**

Plusieurs techniques ont été décrites [29] :

- Méthodes fondées sur l'analyse quantitative du caillot de fibrine (dosage de Ratnoff et Menzie, mesure du poids du caillot...)
- Méthodes basées sur la précipitation du fibrinogène par un traitement thermique à 56°C (méthode de Schalm, de Millar...), par des sels ionorganiques concentrés, par la glycine.
- méthodes chronométriques fondées sur le temps de coagulation plasmatique en présence d'un excès de thrombine.
- dosages immunochimiques.

La méthode de référence est celle de Ratnoff et Menzie. Elle repose sur la mesure quantitative du caillot de fibrine, formé à partir du fibrinogène plasmatique sous l'action de la thrombine [22, 29]. Le plasma, prélevé sur citrate ou EDTA est incubé en présence de thrombine (100 U/ml de plasma) et de verre pilé. Le caillot formé adhère au verre, et après lavage et hydrolyse en milieu basique, sa concentration en tyrosine est déterminée par spectrophotométrie à 650 nm. La concentration est obtenue en multipliant la concentration en tyrosine par 11,7.

Cette méthode, très fiable, est cependant rarement mise en œuvre en raison de sa

lourdeur [22].

Les méthodes fondées sur la précipitation du fibrinogène par l'action de la chaleur sont beaucoup plus simples et fournissent des résultats satisfaisants en clinique.

Méthode de Schalm : le sang prélevé sur EDTA est réparti dans deux tubes à hématocrite. Après centrifugation pendant 5-10 minutes à 2000 g, un des deux tubes est laissé trois minutes au bain-marie à 56-58°C. La concentration en protéines est déterminée par réfractométrie sur les deux tubes. La différence entre les deux mesures est égale à la concentration en fibrinogène [219].

Méthode de Millar : le traitement est le même que dans la méthode de Schalm. Après 3 minutes au bain marie, la longueur de la colonne de fibrinogène (A) et celle de la colonne de fibrinogène + du sérum (B) sont mesurées sur le tube à hématocrite à la loupe binoculaire. Le rapport A/B fournit une mesure volumétrique en fibrinogène. Le résultat en g/l s'obtient en multipliant le rapport par 100 [22, 29]. La réalisation de plusieurs mesures est conseillée afin d'obtenir une valeur moyenne.

Ces deux méthodes sous-estiment la concentration réelle en fibrinogène, mais présentent cependant une bonne corrélation avec la méthode de Ratnoff et Menzie ( $r = 0.72$  pour la méthode de Schalm et  $r = 0.93$  pour la méthode de Millar) [29]. La méthode de Millar est plus précise et d'une meilleure reproductibilité que celle de Schalm [22, 29].

## **II - PARAMETRES DU LCR**

Beaucoup de paramètres cytologiques et biochimiques ont été analysés dans le LCR [273] mais nous ne nous intéresserons ici qu'à ceux susceptibles d'être utilisés comme marqueurs de l'inflammation.

Les aspects pratiques du prélèvement du LCR ont été décrits [77, 128, 228, 232, 273] et nous ne nous y attarderons pas. Notons simplement que le prélèvement en région lombosacrée et préféré chez les bovins en raison de sa simplicité par rapport à la ponction atlanto-occipitale qui nécessite une sédation et une contention de l'animal parfois incompatibles avec son état général, et difficilement réalisables en pratique courante. Bien qu'il soit parfois

conseillé de réaliser le prélèvement le plus près possible de la localisation supposée de la lésion (ponction atlanto-occipitale pour une atteinte supposée de l'encéphale et lombo-sacrée pour une lésion de la moelle épinière caudale) [262], diverses études ne montrent pas de différence de sensibilité entre les deux sites pour la détection des lésions de l'encéphale [230, 232].

## **II.1 - ASPECTS MACROSCOPIQUES ET PHYSIQUES**

Le LCR de l'animal sain est transparent et incolore. Un aspect rosé ou franchement rougeâtre signe une contamination sanguine lors du prélèvement. La présence pathologique de sang est mise en évidence par une couleur jaune-orangé du LCR, appelée xanthochromie, qui apparaît dans les 24 à 48 heures après le passage de globules rouges dans le LCR. Elle fait suite à la destruction des érythrocytes et à la libération de l'hémoglobine. Elle peut persister jusqu'à 2 à 4 semaines après le traumatisme vasculaire.

Un aspect spumeux du LCR quand il est secoué est communément associé à une augmentation de la concentration des protéines totales [77]. Cependant cette modification n'est perceptible qu'à partir de concentrations supérieures à 2g/l [84].

Une augmentation de la turbidité signerait une concentration cellulaire supérieure à 200 leucocytes ou à 400 globules rouges par microlitre [77, 84, 262].

La pression du LCR est fortement modifiée lors d'atteinte centrale, mais n'est pas spécifique d'une inflammation. Elle est dépendante de la position de l'animal, de la pression vasculaire et de l'état d'hydratation [128, 232, 262]. De grandes variations individuelles sont observées chez l'animal sain.

Ces éléments sont cependant très approximatifs. Scott et Penny (1993) [234], n'observent d'ailleurs pas de corrélation entre l'examen macroscopique et les résultats analytiques.

## **II.2 - ANALYSE CYTOLOGIQUE.**

La cellularité globale est évaluée à partir du LCR pur ou dilué à l'aide d'un hémocytomètre ou d'une cellule de Malassez ou de Thomas. Le comptage cellulaire différentiel s'effectue à partir d'un minimum de 20 éléments nucléés et nécessite la concentration du LCR. par cytocentrifugation. En pratique courante, l'utilisation d'une

chambre de sédimentation ou de méthodes de filtration membranaire garantit de bons résultats [77, 128, 262]. En revanche la centrifugation simple abîme les cellules et rend difficile l'interprétation des lames [262].

L'analyse cytologique doit être réalisée dans les 30 minutes après le prélèvement afin de conserver la morphologie cellulaire [77, 262]. Selon Scott (1995) [232] un délai de 2 heures est acceptable. Le seul comptage cellulaire global n'est pas affecté par un délai de 2 à 3 jours, à condition que le prélèvement soit conservé au froid positif [228].

Les colorations sont celles communément utilisées pour la cytologie (Wright-Giemsa, May-Grunwald-Giemsa, Leishman...)

Les cellules nucléées rencontrées sont les suivantes : polynucléaires (principalement neutrophiles et éosinophiles) et mononucléaires (lymphocytes et monocytes /macrophages).

Physiologiquement, les érythrocytes sont absents du LCR des bovins comme des autres espèces de mammifères. Leur présence signe une lésion des capillaires de l'arachnoïde. Cependant, la contamination sanguine, fut-elle minime, semble inévitable lors du prélèvement. La différenciation entre une contamination iatrogène et un processus pathologique se fera selon des critères macroscopiques et microscopiques : la lyse rapide des globules rouges et la libération d'hémoglobine dans le LCR conduit à l'apparition en quelques heures d'une xanthochromie (= couleur jaunâtre) qui persiste plus de 10 jours après le traumatisme [84]. Des images de phagocytose des érythrocytes par les macrophages du LCR seront aussi présentes en cas de processus pathologique.

Selon certains auteurs [262, 273], il ne semble pas que les valeurs des protéines totales et des leucocytes soient affectées par une contamination sanguine lorsque que le nombre de globules rouges n'excède pas 12000 à 20000 / $\mu$ l.

### **II.3 - ANALYSE BIOCHIMIQUE**

L'analyse biochimique du LCR est réalisée sur prélèvement récent (inférieur à deux heures). La réfrigération voire la congélation peuvent être envisagées dans le cas où l'analyse immédiate n'est pas réalisée. La conservation du LCR nécessite cependant la séparation des cellules afin d'éviter la contamination par les protéines issues de leur lyse [128].

### **II.3.1 - Protéines : albumine, globulines et protéines de la phase aiguë**

Le dosage des protéines totales s'effectue par diverses méthodes, dont la plus précise est celle du pyrogallol [232]. Les très faibles concentrations observées même lors de processus pathologique ne permettent pas l'utilisation du réfractomètre, dont la limite inférieure de mesure fiable est de 2,5 à 3,0 g/l. La bandelette urinaire donne une appréciation très rapide et pratique mais la sensibilité (75 %) et la spécificité (80 %) de cette technique sont moyennes pour les concentrations inférieures à 2 g/l [125].

L'analyse précise des différentes fractions protéiques (albumine et globulines) se fait généralement par électrophorèse en gel d'agarose. Cependant, elle n'est pas réalisée en routine, du fait de son faible apport diagnostique chez les ruminants [230, 232]. Ainsi, dans une étude sur diverses atteintes nerveuses centrales des ovins, comprenant la polioencéphalomalacie (n= 4), les méningites bactériennes néonatales (n=8), la listériose (n=4), et la tremblante (n=13), aucune différence significative entre les différentes fractions d'immunoglobulines ( $\alpha_1$  ;  $\alpha_2$  ;  $\beta_1$   $\beta_2$  et  $\gamma$ -globulines) n'a pu être mise en évidence entre ces maladies ni entre les malades et le groupe témoin [230].

Une appréciation rapide de la concentration globale du LCR en immunoglobulines peut être réalisée à l'aide du test de Pandy [43, 128, 234]. Une goutte de LCR est ajoutée à 1 ml d'une solution saturée de phénol. Si la solution devient bleu-blanchâtre et trouble, la concentration en globulines est augmentée.

L'analyse des protéines de la phase aiguë dans le LCR de patients atteints de méningites est réalisée depuis une dizaine d'années en médecine humaine. Les concentrations étant de 100 à 1000 fois plus faibles que dans le sérum, seules des techniques très sensibles (ELISA, agglutination sur billes de latex, techniques néphélométriques) permettent leurs dosages [192, 241, 242]. Ces dosages n'ont à leur actuelle pas été mis en œuvre en médecine bovine.

### **II.3.2 - Autres paramètres biochimiques**

L'activité créatine kinase est considérée comme un marqueur potentiel de l'inflammation chez le cheval [80]. Cependant, une augmentation non spécifique de la CK est observée lors d'atteinte bactérienne, parasitaire, virale, tumorale, dégénérative, et métabolique chez plusieurs espèces domestiques dont les bovins [281]. L'utilité de cette analyse n'est cependant

pas démontrée chez les ruminants en raison de sa faible spécificité **[80, 232]**. De plus, la contamination, même minime, du prélèvement par la CK sanguine conduit à des faux positifs **[107, 262]**.

Selon plusieurs auteurs, la concentration en glucose du LCR, comparée à celle du sérum, est diminué lors d'atteinte bactérienne **[128, 183]**. Les valeurs normales sont comprises entre 60 et 80 % de la glycémie, et seraient inférieures à 50 % lors de méningite bactérienne. Cependant ce ratio est fortement dépendant des variations de la glycémie, et pour cette raison ne semble pas être un marqueur spécifique de l'inflammation **[76, 152, 262]**.

### **III - PARAMETRES DU LAIT**

Parmi les nombreuses modifications du lait provoquées par un état inflammatoire de la mamelle, nous étudierons plus particulièrement les altérations de la cellularité et du taux des protéines de la phase aiguë.

#### **III.1 - COMPTAGES CELLULAIRES**

##### **III.1.1 - Comptage des cellules somatiques (Somatic Cell Count = CCS)**

Bien que possible sur le lait de quartier, le comptage cellulaire est réalisé en pratique sur le lait de mélange des quatre quartiers par les laboratoires et laiteries. IL fait appel à des techniques automatisées de comptage des noyaux cellulaires (système Fossomatic), d'analyse d'images de microscopie en épifluorescence (système Cobra), ou encore à la spectroscopie dans le proche infra-rouge.

Le comptage cellulaire est actuellement la technique de routine de référence pour la détection des mammites sub-cliniques.

##### **III.1.2 - Californian Mastitis Test (CMT)**

Le CMT est un test qui se pratique à l'étable sur le lait de quartier pour la détection des mammites subcliniques. Il consiste à mélanger dans une coupelle 1 à 2 jets de lait à une quantité égale d'un réactif à base de Teepol. L'agglomération de l'ADN suite à la lyse des cellules somatiques est à l'origine de la formation d'un précipité dont l'importance et l'aspect sont fonction de la concentration cellulaire du lait.

Cette méthode est moins précise que le CCS mais possède l'avantage de donner un résultat immédiat et d'être réalisable sur le terrain. De plus, contrairement à l'utilisation qui est faite en routine du CCS, elle permet d'identifier le ou les quartier(s) atteints.

La corrélation avec le CCS est sujette à débat et variable selon les auteurs ( $r = 0.65$  à  $r = 0.89$ ) [214].

### **III.1.3 - Comptage cellulaire différentiel (Differential Cell Count = DCC)**

L'inflammation du parenchyme mammaire est à l'origine d'une augmentation importante du taux de polynucléaires neutrophiles, qui passe de 5-12 % à 33-90 % du nombre total de cellules somatiques [47, 141, 215, 276].

Le DCC est réalisé par des techniques de cytométrie en flux, qui nécessite un appareillage réservé aux laboratoires spécialisés [73, 198]. A l'heure actuelle, de telles techniques n'ont pas d'application pratique courante.

### **III.2 - PROTEINES DE LA PHASE AIGÜE**

Le dosage de ces protéines a été évalué pour la détection des mammites sub-cliniques ou cliniques.

Le dosage de l'albumine est généralement réalisé par des techniques immunochimiques. La corrélation avec le CCS est bonne ( $r = 0.742$ ) [115, 116].

Le dosage de l' $\alpha_1$ -Antitrypsin est réalisé de la même façon que dans le plasma (voir page 36). La corrélation avec le CCS et le taux d'albumine sont bonnes (respectivement  $r = 0.766$  et  $r = 0.888$ ) [116]).

Le dosage de l'haptoglobine et de la SAA est réalisé de la même façon que dans le plasma. L'activité peroxydasique élevée dans le lait est due à la lactoperoxydase et interfère avec les techniques biochimiques basées sur la mesure de l'activité peroxydasique du complexe Hp-Hb en milieu acide [69]. Seules les techniques immunochimiques ELISA et SRID ont été validées [91]. La SAA peut elle aussi être mesurée par ELISA [67, 69, 91].

Une étude préliminaire a montré que le dosage de l' $\alpha_1$ -AGP dans le lait ne donne pas de résultats concluants. Il n'y a pas de différence significative entre les valeurs obtenues chez les sujets sains et les sujets malades [67].

### **III.3 - AUTRES PARAMETRES**

De nombreux autres paramètres ont été proposées comme outils diagnostiques pour la détection des mammites sub-cliniques. L'augmentation de la concentration de la N-acétyl- $\beta$  D glucosaminidase (NaGase), la modification de la conductivité du lait, la diminution de la

concentration en glucose on ainsi fait l'objet de nombreux travaux [18, 19, 189, 238, 291]. Ces différentes techniques ne seront pas développées dans la suite de ce travail.

## **IV - ANALYSE DU LIQUIDE ABDOMINAL**

### **IV.1 - TECHNIQUE DE PRELEVEMENT**

Les aspects techniques de la paracentèse abdominale sont décrits par plusieurs auteurs [9, 108, 147, 186, 280] et ne seront pas revus ici. Signalons toutefois que le lieu de ponction sera de préférence choisi en fonction de la localisation de la lésion supposée, particulièrement lors d'affection chronique. En effet, lors d'atteinte aiguë ou d'exsudat abondant, la paracentèse est généralement couronnée de succès. En revanche, lors de phénomène chronique, les quantités de liquide sont généralement faibles et/ou enclouées dans des logettes fibreuses. La ponction d'un seul site s'avère alors généralement infructueuse. Kopcha et Schultze (1991) [147] préconisent la paracentèse systématique des quatre cadrans de la cavité abdominale afin d'augmenter les chances de recueillir une quantité suffisante de liquide à soumettre à l'analyse : cadrans antérieurs droit et gauche en arrière de l'appendice xyphoïde et 7 centimètres de part et d'autre de la ligne médiane ; cadrans postérieurs droit et gauche juste en avant de l'insertion de la mamelle sur la paroi abdominale, de part et d'autre de la ligne blanche.

Deux à trois millilitres de liquide sont suffisants. Le recueil sur tube EDTA ou hépariné évite la coagulation et autorise une analyse différée de quelques heures si le prélèvement est conservé au réfrigérateur.

### **IV.2 - MARQUEURS D'INTERET DIAGNOSTIQUE**

#### **IV.2.1 - Aspects macroscopiques**

La couleur, l'odeur, la turbidité et la présence d'éléments figurés sont appréciées. Ces paramètres permettent d'avoir une idée immédiate du caractère exsudatif du liquide recueilli. Un aspect trouble, avec une turbidité augmentée signe une forte augmentation de la cellularité et du taux de protéines totales. Une couleur franchement rosée témoigne d'une contamination sanguine lors du prélèvement. Un liquide de couleur verdâtre, avec des fibres alimentaires en

grande quantité sera obtenu lors de la ponction d'un organe digestif (rumen, réseau, caillette, intestin).

#### **IV.2.2 - Paramètres cytologiques.**

Le **nombre de leucocytes totaux** est évalué à l'aide d'un compte globule ou d'une cellule de Malassez ou de Thomas. Pour ces dernières techniques, compte tenu de la cellularité élevée (entre 2000 et 10 000 cellules/ $\mu$ l), une dilution au 10<sup>e</sup> ou au 100<sup>e</sup> est nécessaire.

L'**examen cytologique** est réalisé à partir d'étalements directs sur lames ou après centrifugation du prélèvement. Selon Kopcha et Schultze (1991) [147], l'utilisation d'une centrifugeuse à sérum ou plasma est possible car elle ne dénature pas la morphologie des cellules. Les colorations classiques de la cytologie sont utilisées. Le comptage cellulaire différentiel est réalisé ; la morphologie cellulaire ainsi que la présence de bactéries et/ou de fibres alimentaires sont évaluées. Le comptage cellulaire différentiel est parfois rendu difficile par l'existence de fantômes cellulaires en grand nombre.

#### **IV.2.3 - Paramètres biochimiques**

La teneur en protéines totales peut être appréciée de façon fiable par réfractométrie en raison de la richesse du liquide abdominal (> 10 g/l).

Le dosage du fibrinogène est peut utilisé est difficilement réalisable en pratique courante compte tenu des faibles concentrations présentes dans le liquide abdominal [108].

Le dosage des autres protéines de la phase aiguë n'est à l'heure actuelle pas réalisé dans le liquide abdominal chez les bovins. Cependant, le développement de techniques très sensibles (ELISA par exemple) pourrait permettre l'évaluation du taux d'haptoglobine et de SAA [138]. L'intérêt diagnostique des ces deux marqueurs n'a, pour l'heure, pas été évalué en médecine bovine, mais pourrait s'avérer complémentaire du dosage du taux protéique total (Eckersall, communication personnelle).

## **DEUXIÈME PARTIE**

### **PHYSIOPATHOLOGIE DES MARQUEURS DE L'INFLAMMATION**

## **V - SYNTHÈSE ET RECRUTEMENT DES MARQUEURS**

### **V.1 - MOBILISATION DES LEUCOCYTES**

#### **V.1.1 - schéma général (figure 2)**

Au sein du foyer inflammatoire, l'activation des macrophages et conséquemment des cellules endothéliales et des fibroblastes, et l'activation des lymphocytes T par la reconnaissance de(s) antigène(s) conduit à la libération dans la circulation sanguine de nombreuses cytokines parmi lesquelles l'IL-1, l'IL-3, l'IL-5, l'IL-6 le G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) et le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Stimulating Factor).

Ces cytokines agissent au niveau de la moelle osseuse en diverses combinaisons et sont à l'origine de la différenciation et de la maturation accrue des cellules souches (CFU-GM : Colony Forming Unit - Granulocyte Macrophage) dont sont issues les différentes lignées de granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) et les monocytes/macrophages.

Chez les bovins, le rôle du G-CSF est apparu comme prépondérant dans l'accélération de la granulopoïèse [45, 195].

Le passage des granulocytes dans la circulation sanguine se fait sous l'action des facteurs de libération (GRF : Granulocytes Releasing Factor) spécifique de chaque lignée (NRF : Neutrophil Releasing Factor ; ERF : Eosinophil Releasing Factor ; BRF : Basophil Releasing Factor).

Les actions des différentes cytokines sont schématisées dans la figure 2.

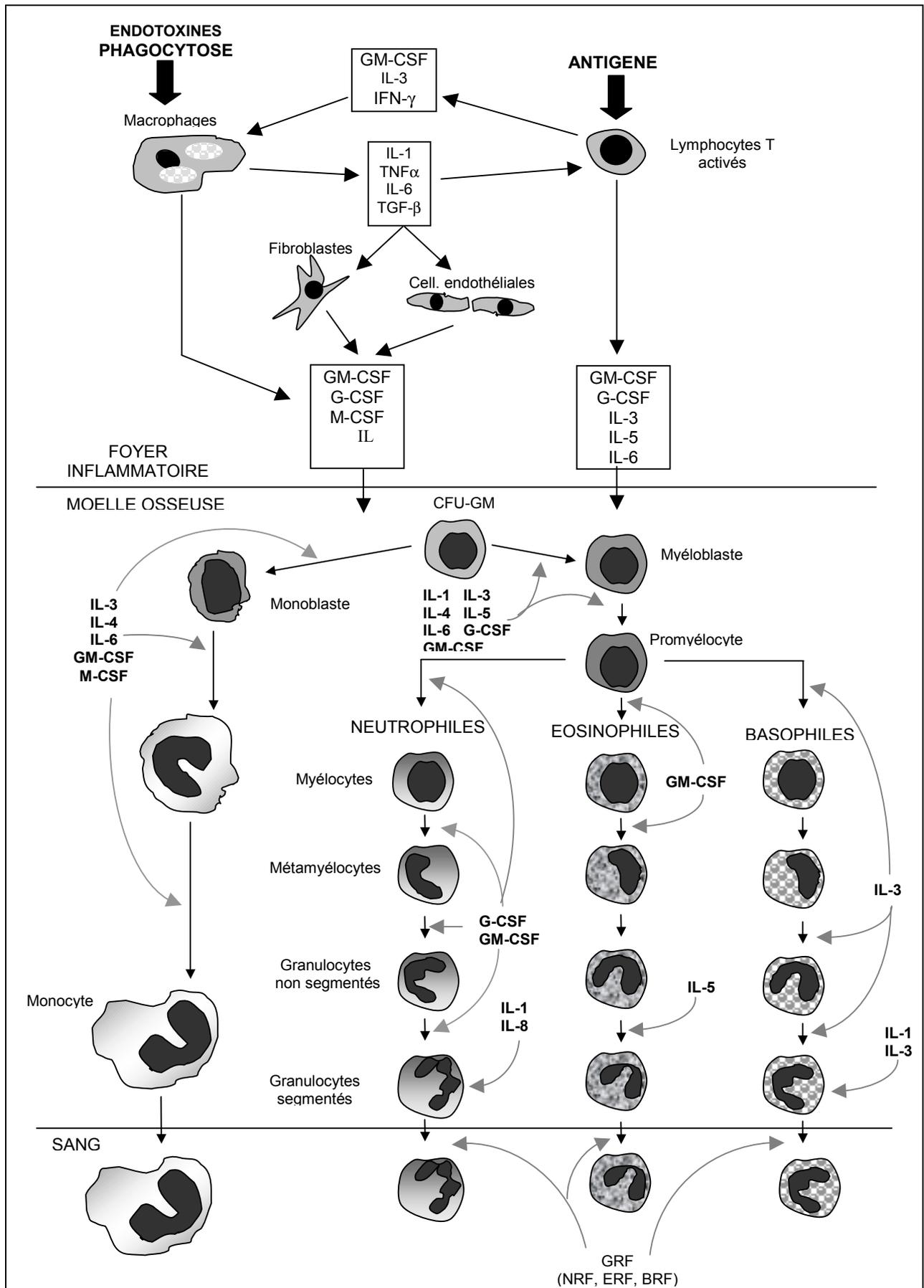


Figure 2 : schéma simplifié de l'activation de la granulopoïèse suite à l'inflammation d'après [168].

## V.2 - SYNTHESE DES PROTEINES DE LA PHASE AIGUË

### V.2.1 - Schéma général

#### a) Synthèse hépatique (figure3)

Suite à leur activation au sein du foyer inflammatoire par les virus, les endotoxines bactériennes ou la destruction tissulaire, les macrophages produisent un grand nombre d'interleukines, dont l'IL-1, l'IL-6 et le TNF $\alpha$ . Ces cytokines "pro-inflammatoires" activent les leucocytes (neutrophiles, lymphocytes, et monocytes), les cellules endothéliales, et les fibroblastes qui produisent à leur tour diverses cytokines. Les cytokines libérées dans la circulation sanguine agissent sur les hépatocytes et induisent la synthèse des protéines de la phase aiguë. En outre, la stimulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien par l'IL1 et le TNF $\alpha$  conduit à la production de glucocorticoïdes endogènes. Ceux-ci exercent à la fois une action positive sur la synthèse hépatique des PPA et un rétrocontrôle négatif sur la réaction inflammatoire locale et systémique (flèches discontinues).

#### b) Synthèse extra-hépatique (tableau 4)

L'existence d'une synthèse extra-hépatique, induite par l'inflammation, de certaines protéines de la phase aiguë a été mise en évidence chez la souris, le rat, le hamster et l'homme [78, 261, 265, 266]. La signification de cette expression est mal connue. Selon Uhlar et al. (1999) [265], elle permettrait une défense locale immédiate au sein du foyer inflammatoire, avant que la synthèse hépatique ne soit induite.

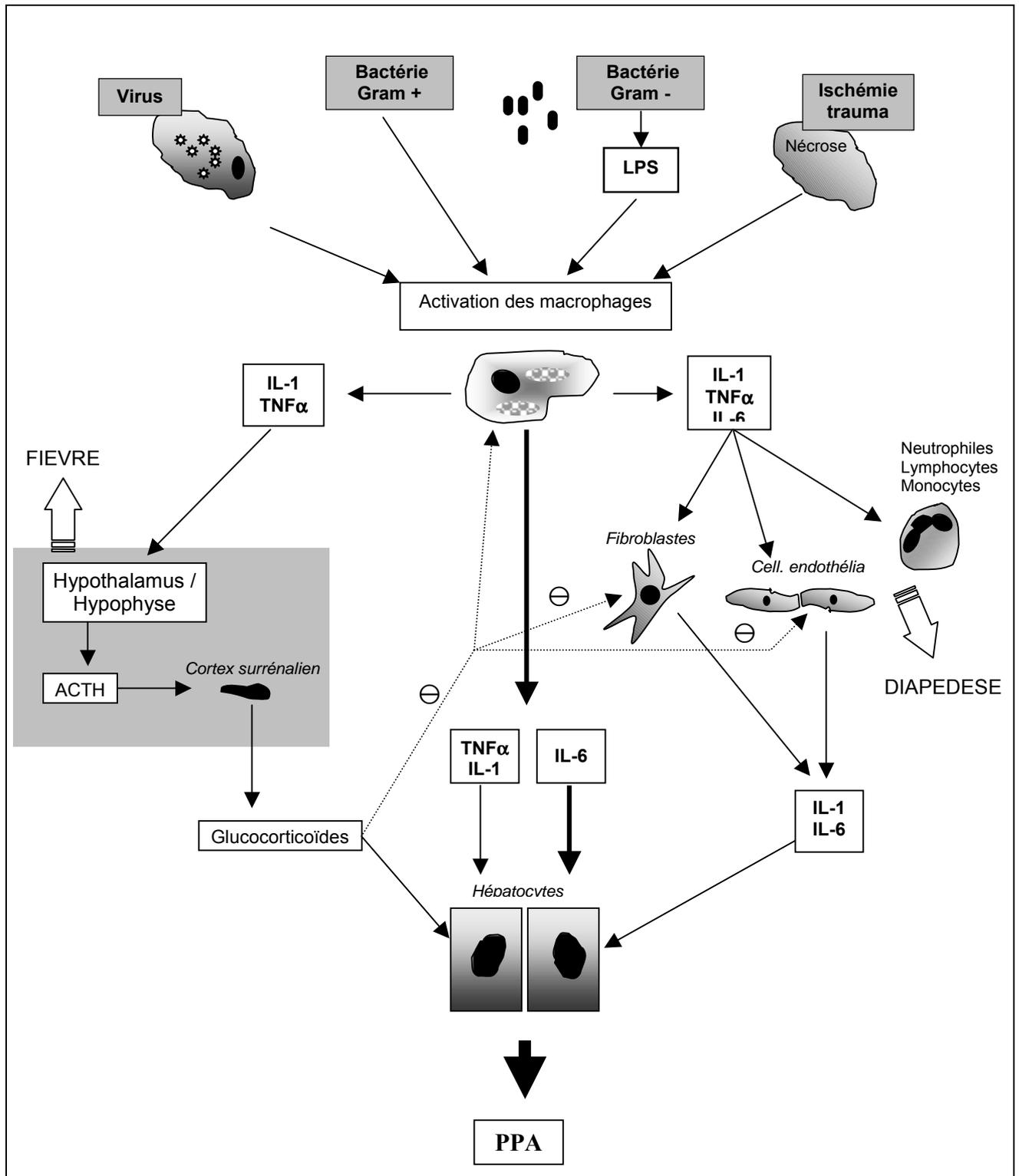


Figure 3 : mécanisme général de l'induction de la synthèse des protéines de la phase aiguë lors de la réaction inflammatoire chez les bovins (modifié d'après Gruys, 1994[92]).

Tableau 4 : sites extra-hépatiques de synthèse de la A-SAA et de l' $\alpha_1$ -AGP.

| Type cellulaire ou organe                     | $\alpha_1$ - AGP | A-SAA | Références             |
|---|------------------|-------|------------------------|
| Rein : cellule épithéliales                   | +                | +     | <b>[78, 265, 266]</b>  |
| Adipocytes                                    |                  | +     |                        |
| Rate : cellules épithéliales                  | +                | +     |                        |
| Oesophage : cellules épithéliales             |                  | +     |                        |
| Iléon : cellules épithéliales                 | +                | +     |                        |
| Estomac : cellules épithéliales               | +                | +     |                        |
| Colon : cellules épithéliales                 | +                | +     |                        |
| Prostate : cellules épithéliales              | +                |       |                        |
| Tissu mammaire : cellules épithéliales        | +                | +     |                        |
| Fibroblastes pulmonaires                      | +                |       |                        |
| Pneumocytes II                                | +                |       |                        |
| Macrophages alvéolaires                       | +                | +     |                        |
| Monocytes/macrophages                         | +                | +     |                        |
| Lymphocytes                                   | +                | +     |                        |
| Granulocytes                                  | +                |       |                        |
| Muscles lisses                                |                  | +     |                        |
| Synoviocytes (arthrite rhumatoïde)            |                  | +     | <b>[187]</b>           |
| Cellules endothéliales                        | +                | +     | <b>[187, 265, 266]</b> |
| Encéphale : neurones,<br>Cellules de Purkinje |                  | +     | <b>[261]</b>           |

## V.2.2 - Action des cytokines et des glucocorticoïdes

### a) Les cytokines

*In vivo*, chez le rat, 15 minutes après une injection intraveineuse, 41 % de l'IL-6, 33% du TNF $\alpha$  et seulement 8% de l'IL-1 $\beta$  injectées apparaissent dans le foie [97]. Ceci indique que les hépatocytes sont une cible privilégiée des cytokines de l'inflammation. Bien que de nombreux autres facteurs aient été recensés, ces cytokines sont à l'heure actuelle considérées comme les principaux médiateurs pouvant activer la synthèse des protéines de la phase aiguë.

- Les groupes I et II chez l'homme

Chez l'homme, une classification basée sur les différences de profil de stimulation des protéines de la phase aiguë par les principales cytokines pro-inflammatoires a été proposée par Baumann et Gauldie (1994) [14] : la production des PPA de type I ( $\alpha_1$ -AGP, la SAA, la CRP, protéine C<sub>3</sub> du complément) serait principalement sous la dépendance des cytokines de type IL-1 (l'IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , et TNF $\beta$ ). L'IL-6 agirait de façon synergique avec le TNF $\alpha$  et l'IL-1.

La synthèse des PPA de type II, (chez l'homme : fibrinogène, haptoglobine,  $\alpha_1$ -Protéase Inhibitor,  $\alpha_1$ -Antichymotrypsine et  $\alpha_2$ -Macroglobuline) serait stimulée par les cytokines de type IL-6. L'IL-6, l'IL-11, le LIF (Leukemia Inhibitory Factor), l'OSM (Oncostatin M), le CNTF (Ciliary NeuroTrophic Factor) font partie de ce groupe, en raison de leur similitude d'action. L'IL-1 et le TNF $\alpha$  ne stimuleraient pas la production des PPA de type 2, et auraient même une action inhibitrice sur la production des PPA de ce groupe (fibrinogène par exemple).

Cette classification a été établie à partir d'hépatome humain (HepG2, HuH7) [157, 208] ou murin (H 35) [15]. Il semble qu'il y ait de grandes différences selon la nature et la lignée des hépatocytes mis en culture [105, 155]. Dans un modèle d'hépatome humain HuH 7, l'IL-1 $\beta$  s'est révélée être la principale cytokine promotrice de la synthèse de la SAA [208] tandis que l'IL-6 et le TNF $\alpha$  avaient une action additive à l'IL-1. Dans une autre étude [30], seule l'IL-6 a été capable d'induire la production de la quasi totalité des PPA (dont la CRP et la SAA) à partir d'hépatocytes humain. En revanche, l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  n'ont eu qu'une action limitée et n'ont pas stimulé la synthèse de CRP et de SAA.

Il semble à l'heure actuelle que l'IL-6 soit le principal agent de la régulation de la synthèse des PPA par les hépatocytes humains [30, 96, 105]. l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  potentialisent l'effet de l'IL-6 pour certaines PPA (SAA, CRP et  $\alpha_1$ -AGP en particulier) tandis qu'elles dépriment l'action de l'IL-6 sur la synthèse de certaines PPA comme le fibrinogène (Tableau 5) [14, 81, 148].

Tableau 5 :Régulation de la synthèse hépatique des différentes protéines de la phase aiguë par les cytokines IL-6 ; IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$  chez l'homme d'après [105].

|                           | IL-6 | IL1 $\beta$ | TNF $\alpha$ |
|---------------------------|------|-------------|--------------|
| CRP                       | ↑↑↑  | 0*          | 0*           |
| SAA                       | ↑↑↑  | 0*          | 0*           |
| $\alpha_1$ -AT            | ↑    | 0           | 0            |
| $\alpha_1$ -AGP           | ↑    | 0*          | 0            |
| Haptoglobine              | ↑↑   | 0           | 0/ -         |
| Fibrinogène               | ↑↑   | -           | -            |
| Albumine                  | -    | -           | -            |
| Transferrine              | -    | -           | -            |
| Fibronectine              | -    | 0           | 0            |
| $\alpha_2$ macroglobuline | 0    | 0           | -            |

Légende : ↑↑↑; ↑↑; ↑ : augmentation de la synthèse marquée, modérée, légère ; 0 : pas d'influence ; - : inhibition de la synthèse ; \* : action synergique avec IL-6.

Les difficultés à démontrer l'action respective des différentes cytokines pro-inflammatoires proviennent des multiples interactions entre ces médiateurs. Chez l'homme l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  induisent la production d'IL-6 par les macrophages [48, 105], celle-ci exerçant un rétrocontrôle négatif en réduisant la libération d'IL-1 et du TNF $\alpha$  [81]. La présence de macrophages au sein du parenchyme hépatique, plus ou moins bien exclus lors de la mise en culture des hépatocytes, peut aussi expliquer l'existence de résultats contradictoires lors d'étude *in vitro*.

*In vitro*, d'autres cytokines, qualifiées d' «anti-inflammatoires» ont montré une action inhibitrice sur la synthèse des cytokines pro-inflammatoires. Il s'agit principalement de l'IL-4, de l'IL-10 et de l'IL-13 [130, 153]. Elles agiraient en réduisant l'activation des facteurs de transcription de ces cytokines, en augmentant le catabolisme de leur ARN messager ou

directement en réduisant l'activité du facteur de transcription NF- $\kappa$ B par préservation de son inhibiteur I $\kappa$ -B [150].

- Actions des cytokines chez les bovins

Les cytokines principalement explorées chez les bovins sont l'IL-1 $\beta$ , IL-6 et le TNF $\alpha$  en raison de leur libération massive dans la circulation sanguine lors de réaction inflammatoire. [181, 243, 274]. Les études rapportées ont été réalisées *in vivo* et depuis peu *in vitro*, à partir de cultures d'hépatocytes bovins.

Ces trois médiateurs ont, comme chez l'homme, une action promotrice sur la synthèse et la libération des PPA bovines [6, 12, 88, 180, 182]. Cependant, par rapport aux modèles humains et murins, les données disponibles chez les bovins apparaissent différentes.

L'IL-6 joue un rôle majeur dans l'induction de la synthèse hépatique des PPA, mais les protéines induites par cette interleukine ne sont pas les mêmes suivant le modèle utilisé (*in vitro* ou *in vivo*), la nature de l'IL-6 (recombinante humaine ou bovine), les doses, les voies d'administration (intraveineuse ou sous-cutanée), la durée d'exposition (une seule ou plusieurs injections ou encore perfusion lente sur plusieurs jours).

Ainsi l'administration prolongée d'IL-6 recombinante humaine à des veaux (perfusion intra-veineuse continue de  $1,3 \cdot 10^7$  U de RhIL-6 dans 2 ml de milieu à raison de  $0,01 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$  pendant 7 jours), induit une augmentation marquée de la concentration d'haptoglobine et du fibrinogène entre le deuxième et le douzième jours post-injection [182]. Les concentrations en  $\alpha_1$ -AGP sont restées inchangées. L'augmentation observée était beaucoup plus importante que lors de l'administration d'une dose équivalente d'RhIL-6 ( $1,3 \cdot 10^7$  U), 2 fois à 24 heures d'intervalle.

Ces résultats semblent confirmés par une étude *in vitro* [180]. L'addition de RhIL-6 (entre 10 et  $1000 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$  de milieu, pendant 24 heures) à des cultures d'hépatocytes bovins, seule ou associée au TNF $\alpha$  (mêmes doses), entraîne une augmentation significative de la quantité d'haptoglobine retrouvée dans le milieu de culture.

En revanche, dans un autre modèle *in vitro* [6], l'IL-6 seule ne s'est pas révélée capable d'induire la synthèse d'Hp même à forte dose ( $100$  à  $900 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$  de milieu) tandis qu'elle provoquait l'augmentation de la SAA. Cependant, l'association synergique de l'IL-6 et du

TNF $\alpha$  conduisait à une synthèse accrue de ces deux PPA.

L'action du TNF $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  sur les cellules hépatiques reste encore très floue dans l'espèce bovine. Il semble que le TNF $\alpha$  seul puisse induire la synthèse de certaines des PPA, dont l'Hp et la SAA [6, 180] et qu'il agisse en synergie avec l'IL-6 [6]. Les données concernant l'IL-1 $\beta$  sont très peu nombreuses et contradictoires. Alors que Nagakawa-Tosa *et al.* (1995) [180], utilisant de la RhIL-1 $\beta$ , n'obtiennent pas d'augmentation de l'Hp *in vitro* quelle que soit la concentration utilisée, l'étude *in vivo* de Godson *et al.* (1995) [88] tend à montrer au contraire que la RboIL-1 $\beta$  exerce une action fortement promotrice pour l'Hp, le fibrinogène, l' $\alpha_1$ -AGP et ceci de façon dose-dépendante. Cependant l'IL-1 peut induire la production d'IL-6 chez l'homme [48] et de telles interactions, difficilement contrôlables lors de l'utilisation d'un modèle *in vivo*, existent vraisemblablement chez les bovins.

#### b) Les glucocorticoïdes

L'effet des glucocorticoïdes est double et partiellement contradictoire. Ils exercent une action positive sur la synthèse hépatique des PPA, et il en réduisent l'expression soit par action directe sur les hépatocytes, soit indirectement par inhibition de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes/macrophages [14, 130, 175, 269].

Ainsi l'adjonction de dexaméthasone ( $10^{-8}$  à  $10^{-6}$  M), et dans une moindre mesure de cortisol ( $10^{-8}$  à  $10^{-6}$  M), dans le milieu de culture d'hépatocytes bovins, induit la production d'haptoglobine [106, 179, 288]. Les concentrations en Hp étaient de 7 à 100 fois supérieures à celles mesurées en l'absence de corticoïdes. Outre cet effet direct, les glucocorticoïdes et les métabolites du cortisol (hydrocortisone) potentialisent l'action des cytokines pro-inflammatoires sur les hépatocytes [6].

En revanche, le cortisol endogène, de même que la dexaméthasone sont connus pour leurs propriétés immuno-modulatrices et anti-inflammatoires. Les glucocorticoïdes inhibent la synthèse d'IL-6 par les macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes [269], et de l'IL-1 $\beta$  et du TNF $\alpha$  par les macrophages et les neutrophiles [14, 130].

#### c) Autres facteurs de régulation

Des facteurs de régulation autres que les cytokines et les glucocorticoïdes ont été mis en évidence. Certains facteurs hormonaux, comme le HGF (Hepatocyte Growth Factor) ;

l'hormone de croissance (GH - Growth Hormone) ont des actions inhibitrices ou promotrices selon les espèces et les cellules cibles concernées [53, 94, 175].

Les oestrogènes, la prostaglandine F2 $\alpha$ , le leucotriène B4, le LPS, l'insuline, les produit de l'oxygène actifs, le potentiel rédox de surface... sont d'autres éléments qui ont un effet promoteur ou répressif mineur sur la synthèse des PPA [46, 96, 240].

Ces travaux, bien qu'ils n'aboutissent pas forcément aux mêmes résultats mettent cependant en évidence quelques points importants :

1- L'IL-6, le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ , les glucocorticoïdes et les autres facteurs agissent en combinaisons additives, synergiques ou inhibitrices extrêmement complexes qui sont encore mal connues chez les bovins. Ces multiples combinaisons sont propres à chaque espèce et à l'origine de la variabilité des profils de synthèse des PPA entre les espèces [6, 88, 180].

2- La classification des PPA en type I et II suivant le profil de cytokines, proposée pour l'homme, la souris et le rat [14], peut difficilement s'appliquer à l'espèce bovine [180].

3- L'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 agirait de façon dose-dépendante tandis que l'activité du TNF $\alpha$  diminuerait au-delà d'une valeur seuil [6, 180]. Si l'on considère qu'une réaction inflammatoire génère d'autant plus de cytokines qu'elle est intense et étendue, il paraîtrait donc logique qu'il existe une relation, au moins théorique, entre les concentrations sériques des PPA et la gravité des signes cliniques et/ou l'étendue des lésions tissulaires.

4- Les raisons évoquées pour expliquer les résultats discordants entre les différentes études sont nombreuses. En particulier le fait d'utiliser de l'IL-6 recombinante humaine chez les bovins ne permet pas de savoir avec certitude si elle agit de façon identique à une cytokine recombinante bovine. Les résultats obtenus à partir d'RboIL-1 $\beta$  [88] sont prometteurs et mériteraient d'être étendus à des modèles *in vivo*. En outre, *in vivo*, les multiples interactions entre les différents médiateurs de l'inflammation sont difficilement contrôlables, rendant difficile la comparaison des études menées *in vivo* et *in vitro*.

### V.2.3 - Mécanismes intracellulaires

Les connaissances concernant les mécanismes intracellulaires d'induction et de répression de la synthèse des différentes protéines de la phase aiguë ont considérablement progressées ces quinze dernières années chez l'homme, le lapin, la souris et le rat (revues complètes dans [78, 130, 155, 265]). En ce qui concerne l'espèce bovine, cet aspect de la régulation des PPA reste encore pratiquement inexploré. Les données présentées ci-dessus sont donc principalement relatives à l'homme et aux animaux de laboratoire. Malgré des différences probables, les mécanismes intracellulaires semblent être relativement proches chez les mammifères.

#### a) Induction

La synthèse et la libération des PPA par les hépatocytes est régulée au niveau transcriptionnel et traductionnel.

- Régulation transcriptionnelle (figure 4)

Les cytokines inductrices se lient de façon spécifique à leur récepteur membranaire (IL-6R, IL-1R et TNF-R). Il semble exister de nombreuses voies métaboliques conduisant à la transcription des gènes codant pour les PPA, suivant la nature des cytokines inductrices et des facteurs de transcription mis en jeu. Ces facteurs de transcription sont des protéines nucléaires et/ou cytoplasmiques qui préexistent avant toute inflammation. Lors d'inflammation, ils sont activés par des protéines kinases. En outre, leur nombre peut augmenter par la transcription accrue de leur(s) gène(s) lors d'inflammation [155].

Parmi les facteurs de transcription décrits ces dernières années, trois familles semblent être prépondérantes : celle des STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) avec en particulier le STAT<sub>3</sub>, encore appelé APRF (Acute Phase Response Factor) ; celle des NF-IL6 (Nuclear Factor pour l'IL-6) encore appelé C/EBP( $\alpha,\beta,\delta$ ) (CAAT-Enhancer Binding Protein), et la famille du NF $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa B).

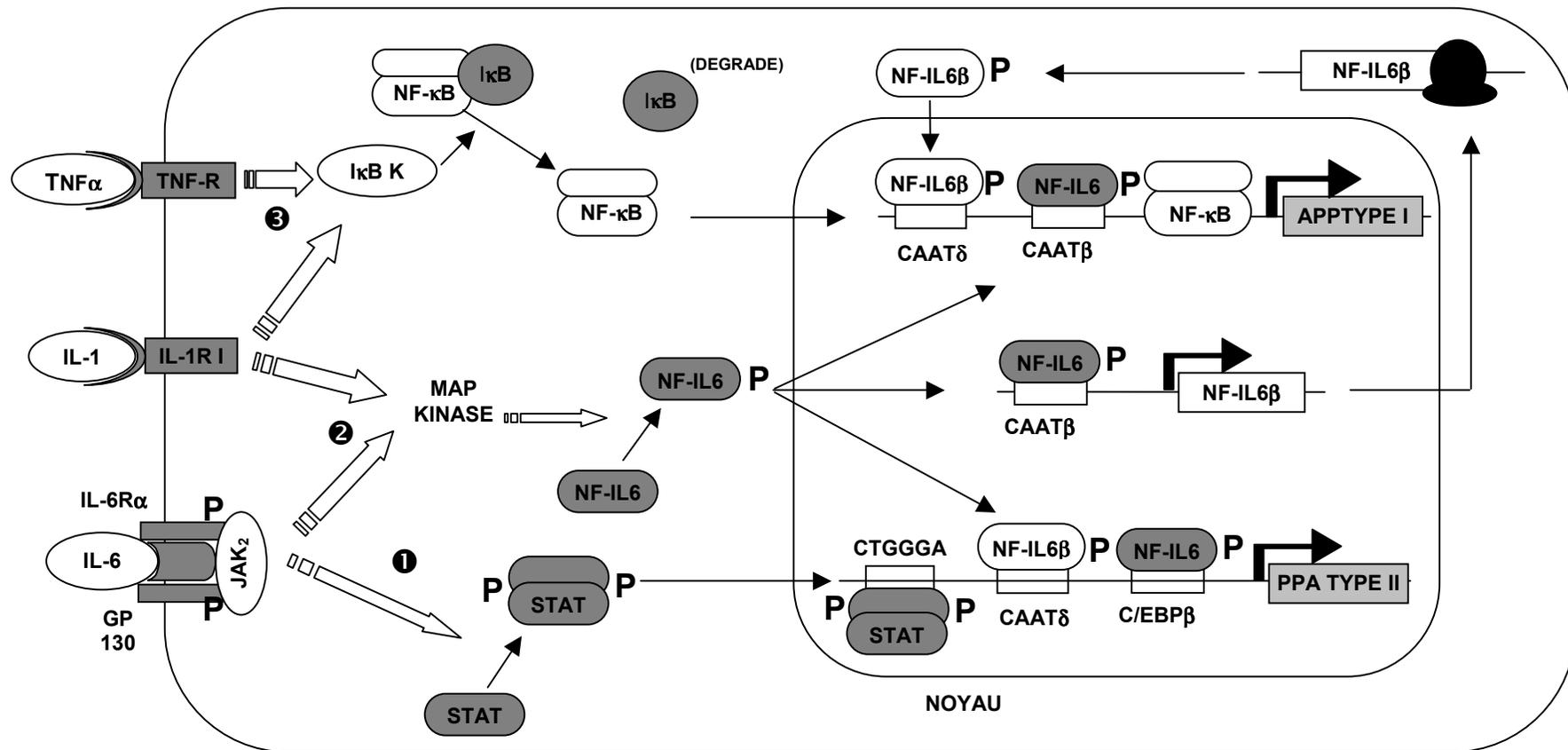


Figure 4 : mécanisme intracellulaire proposé pour l'induction de la synthèse des PPA chez l'homme (d'après [130, 265])[74, 155, 175]).

- **Voie IL-6 – JAK<sub>2</sub> – STAT** (figure4, ❶)

La similitude de réponse de biosynthèse des PPA avec les cytokines du type IL-6 (IL-6, IL-11, LIF, OSM, CNTF) provient du fait que leurs récepteurs membranaires (IL-6R $\alpha$ , IL11R...) ou solubles (sIL-6R, sIL11R...) s'associent avec une protéine messagère transmembranaire comprenant au moins une sous-unité gp130 [14, 74, 175]. La formation du complexe cytokine-récepteur conduit à la phosphorylation des sous-unités gp130 et à l'activation des tyrosines kinases cytoplasmiques du type JAK<sub>2</sub> (Junus Associated Tyrosine Kinases). Ces kinases sont responsables de la phosphorylation des facteurs de transcription de la famille des STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), dont STAT<sub>3</sub> [104, 175]. Ceux-ci s'associent alors en homo- ou hétérodimères et pénètrent dans le noyau où ils reconnaissent une séquence consensus de l'ADN (CTGGGA) des PPA de type II conduisant à la transcription de ces gènes [14, 74, 105, 155].

- **Voie IL-1/ IL-6 – MAP Kinases – NFIL-6 / NFIL-6 $\beta$**  (figure 4, ❷)

Cette voie est commune à l'IL-6 est à l'IL-1. La liaison de ces médiateurs à leurs récepteurs membranaires est à l'origine d'une cascade métabolique conduisant à l'activation des protéines kinases du type MAP Kinase (Mitogen Activated Protein Kinase). Le facteur de transcription NFIL-6 (encore appelé C/EBP $\beta$  pour CAAT-Enhancer Binding Protein  $\beta$ ) est alors phosphorylé par ces kinases activées, pénètre dans le noyau et reconnaît une séquence consensus (CAAT $\beta$ ) dans la région promotrice des gènes des PPA de type I et certaines du groupe II [14, 74, 130, 155, 175].

NFIL-6 induit aussi la transcription des gènes du facteur de transcription NFIL-6 $\beta$  (C/EBP $\delta$ ) qui, une fois synthétisé et phosphorylé, pénètre dans le noyau et contribue à la transcription des protéines de la phase aiguë de type I et II (dont la SAA) [130].

- **Voie IL-1 / TNF $\alpha$  – NF $\kappa$ B-I $\kappa$ B** (figure 4, ❸)

Cette voie est l'une des voies majeures de l'induction de la synthèse des PPA de type I, en particulier la SAA et l' $\alpha_1$ -AGP [14, 78, 130, 265]. A l'état normal, les protéines NF $\kappa$ B (association de deux sous-unités, principalement p50 et p65) sont inactivées par le facteur I $\kappa$ B (Inhibitor  $\kappa$ B) et sont séquestrées dans le cytoplasme. La liaison de l'IL-1 et du TNF $\alpha$  à leur récepteurs (IL-1R et TNF-R) conduit, par l'intermédiaire de kinases (I $\kappa$ B Kinases) à la

phosphorylation de I $\kappa$ B. Cette phosphorylation conduit à la reconnaissance et à la dégradation de I $\kappa$ B par une série de protéases. Libéré de son inhibiteur, NF $\kappa$ B peut alors pénétrer dans le noyau, où il est phosphorylé par la Mitogen Associated Proteinase K (MAPK) et la Proteinase K (PKA). Enfin, il se lie à une séquence spécifique dans la région promotrice des gènes des PPA de type I et induit leur transcription [158].

De nombreux autres facteurs de transcription extra-hépatiques ont été décrits, principalement pour la SAA (Sp1, AP-2, SAF), qui est la PPA la plus explorée à l'heure actuelle chez l'homme compte tenu des implications pathologiques lors de processus chroniques (athérosclérose, amyloïdose, arthrite rhumatoïde) [205, 206, 265].

Les sites de liaison des différents facteurs de transcription sont représentés de façon différentes dans les séquences promotrices des PPA selon les espèces. Ainsi STAT<sub>3</sub> possède un site de liaison dans les gènes de l' $\alpha_2$  macroglobuline humaine et du rat, mais pas chez la souris. En outre, certaines PPA possèdent des séquences consensus de plusieurs facteurs de transcription dans leur zone promotrice. Chez l'homme, par exemple, les sites de liaison du NF $\kappa$ B et de NF-IL6 $\beta$  et NF-IL6 $\delta$  sont présents dans les gènes de la SAA<sub>2-2</sub> ce qui expliquerait l'action synergique de l'IL-1 et de l'IL-6 [130, 155].

Cette diversité des schémas d'induction et de transcription serait en partie à l'origine des différences des profils de réponse en PPA observées entre les espèces.

- Régulation traductionnelle

En présence d'une inflammation et/ou de la stimulation des cytokines pro-inflammatoires *in vitro*, on observe une augmentation de la stabilité des ARN messagers des PPA. Ceci serait dû à l'existence d'une séquence poly-Adénosine en 5', plus longue lorsque les hépatocytes sont stimulés par l'inflammation, rendant les ARNm moins sensibles aux exonucléases cytoplasmiques [130]. Ce phénomène a été décrit pour les ARNm de la SAA et de l' $\alpha_1$ -AGP.

En outre, il se pourrait que ces exonucléases soient absentes ou dégradées lors d'inflammation [130].

Une autre composante de la régulation post-transcriptionnelle des PPA concerne leur degré de glycosylation, qui détermine leur sécrétion dans la circulation sanguine et affecte leur fonctionnalité. Ce phénomène est sous le contrôle des différentes cytokines et des

glucocorticoïdes [155, 156].

b) Arrêt de la synthèse

La résolution de l'inflammation conduit à la réduction de la stimulation des hépatocytes par les cytokines pro-inflammatoires et par voie de conséquence à la diminution de la synthèse des PPA. Cependant, de nombreux phénomènes intracellulaires agissent aussi dans ce sens et interviennent sur la transmission du signal de transcription (récepteurs antagonistes et récepteurs "appâts") et sur la transcription elle-même (inhibiteurs des facteurs de transcription et facteurs de répression de la transcription).

- Régulation de la transcription

- **Inhibiteurs des facteurs de transcription**

Ces inhibiteurs agissent en dissociant les facteurs de transcription (famille des STAT, NF-IL6 et NFκB) de leur séquence consensus présente dans la région promotrice des gènes des PPA. Pour la SAA, la protéine IκBα remplit ce rôle (figure 5). Une zone de liaison pour NFκB a été en effet mise en évidence dans la zone promotrice du gène codant pour IκB. Une fois synthétisé puis phosphorylé, IκBα intègre le noyau, où il se lie à NFκB. Cette liaison entraîne la dissociation de NFκB de l'ADN cible et l'exportation du complexe NFκB-IκBα vers le cytosol [130].

Pour les autres facteurs de transcription (STAT et NF-IL6) ces inhibiteurs sont mal connus. La formation de complexe entre les protéines STAT et d'autres protéines, les PIAS (Protein Inhibitors of activated STAT) aurait un rôle inhibiteur [104].

- **Facteurs de répression de la transcription**

Ces facteurs agissent en entrant en compétition avec les facteurs de transcription pour la liaison avec la séquence d'ADN cible. Pour la SAA, le facteur Ying-Yang 1 (YY1) a été mis en évidence chez le rat et l'homme. Il possède une séquence de liaison à l'ADN empiétant sur celle de NFκB, et en empêche la liaison quant il est lui même présent (figure 5). La régulation de sa synthèse et de son activité sont encore mal connues.

Un variant de NFκB, le dimère p50-p52, aurait une forte affinité pour le site de liaison de NFκB, mais n'induirait pas la transcription des gènes de la SAA [130].

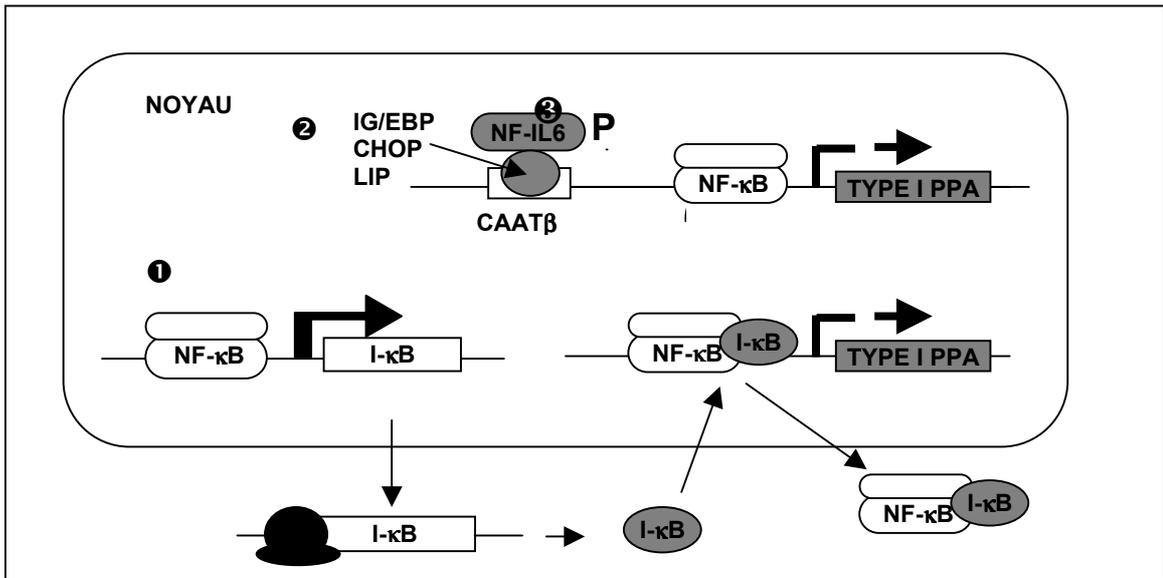
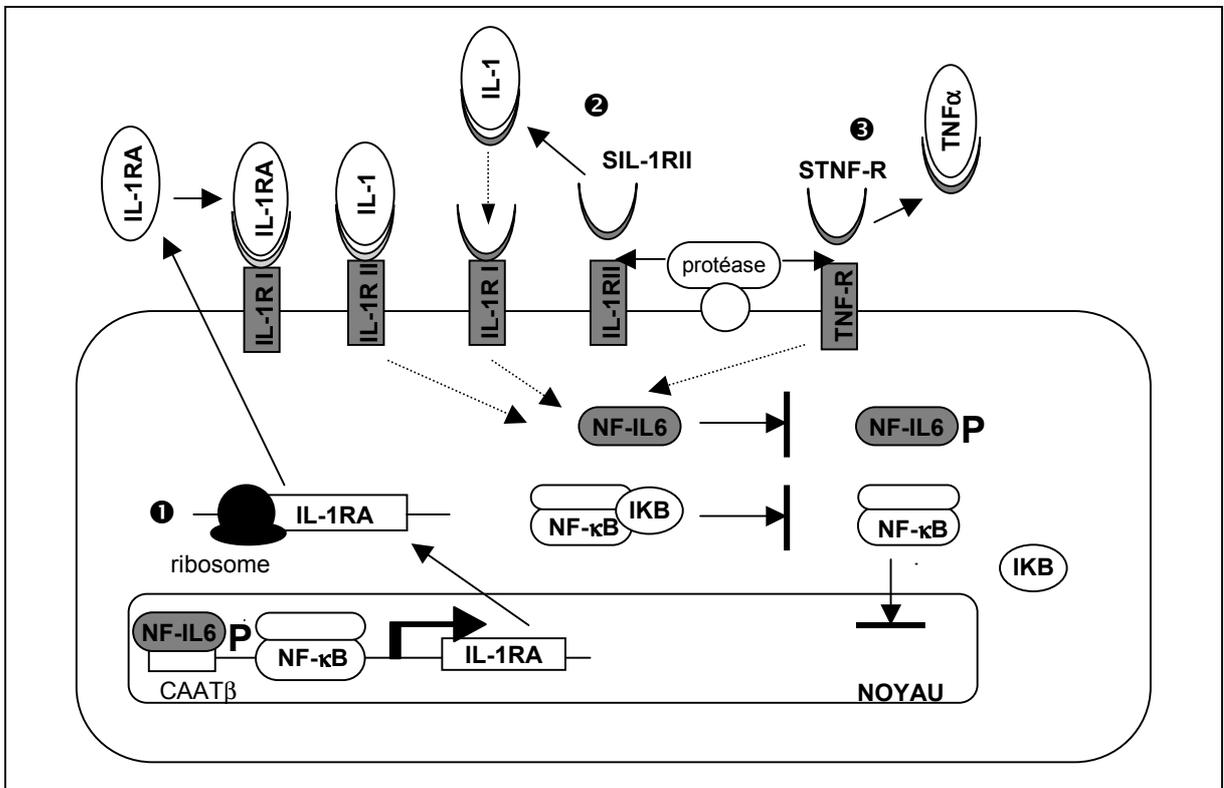


Figure 5 : Intervention des inhibiteurs des facteurs de transcription (IκB, ❶) et des facteurs de répression de la transcription (❷) dans l'arrêt de la transcription des gènes codant pour les protéines de la phase aiguë chez l'homme, d'après [130] et [207]).

Figure 6 : Intervention de l'IL-1 Receptor Antagonist (IL-1Ra, ❶) et des récepteurs "appâts" (sIL-1RII, ❷ et sTNF-R, ❸) dans la régulation de la transmission du message de transcription des gènes des PPA chez l'homme, d'après [130].



D'autres facteurs de répression existent pour NF-IL6 et NF-IL6 $\beta$ . Il s'agirait de protéines cytoplasmiques (CHOP, LIP, Ig/EBP...), qui après phosphorylation reconnaîtraient une séquence d'ADN dont une partie serait commune avec celle à laquelle se lient ces facteurs de transcription (figure 5) [207].

- **L'IL-1Ra (IL-1 Receptor antagonist)**

L'IL-1Ra est synthétisé par les monocytes/macrophages, les fibroblastes, les neutrophiles, les cellules épithéliales et les hépatocytes. Il est sécrété dans le milieu extracellulaire sous forme glycosylé, d'où le nom de sIL-1Ra (soluble IL-1Ra) qui lui est parfois donné. Il est présent à de très faibles concentrations chez les sujets sains, et en quantité plus élevée dans le plasma, les urines et les liquides inflammatoires chez les patients atteints de maladies infectieuses, de certains cancers [130, 175]. La transcription des gènes codant pour cette protéine est sous la dépendance du NF $\kappa$ B et de NF-IL6 (figure 6). L'IL-1Ra possède une affinité pour le récepteur membranaire IL-1RI équivalente à celle de l'IL-1. Cependant, la liaison IL-1Ra-IL-1RI ne conduit pas à la transmission du signal de transcription. La compétition entre l'IL-1 et l'IL-1Ra pour le récepteur conduit à une diminution de l'activation des voies du NF $\kappa$ B et du NF-IL6 pouvant aller jusqu'à bloquer la synthèse de SAA *in vivo* chez la souris [130].

- **Récepteurs "appâts"**

Ces récepteurs, qu'il soient membranaires ou solubles sont qualifiés "d'appâts" en raison de leur affinité pour les cytokines pro-inflammatoires et de leur incapacité à transmettre le signal de transcription.

Il existe deux types de récepteurs membranaires pour l'IL-1 : IL-1RI et IL-1RII. En raison d'une structure protéique intra-cytoplasmique incomplète (29 acides aminés contre 215 pour IL-1RI), IL-1RII est incapable de transmettre le signal de transcription après la liaison avec IL-1. De façon similaire à IL-1Ra, IL-1RII existe sous une forme soluble (sIL-1RII), sécrétée par les neutrophiles et les monocytes/macrophages en quantité beaucoup plus importante lors de sepsis ou d'inflammation qu'en temps normal. De plus sIL-1RII conserve son affinité pour IL-1 $\beta$ , ce qui conduit à restreindre le nombre de molécules d'IL-1 $\beta$  susceptibles d'activer les voies de la transcription des gènes des PPA (figure 6).

Un mécanisme semblable existe pour les récepteurs membranaires du TNF- $\alpha$  (TNF-R55

et TNF-R75) [130]. Le clivage par une protéase du type métalloprotéase de la partie extracellulaire de ces récepteurs conduit à la libération de récepteurs solubles (sTNF-R55 et sTNF-R75), qui conservent leur capacité de liaison au TNF $\alpha$ . En entrant en compétition avec les récepteurs membranaires intacts pour le TNF $\alpha$  libre, ces "appâts" réduisent l'activation des cellules cibles [175] (figure 6).

- Cytokines anti-inflammatoires et glucocorticoïdes

Nous avons vu précédemment le rôle anti-inflammatoire indirect des glucocorticoïdes, par inhibition de la synthèse par les monocytes/macrophages des cytokines pro-inflammatoires (voir page 55) ainsi que l'existence de cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL10) (voir page 52).

- c) Passage à la chronicité

NF $\kappa$ B contrôle la transcription des gènes codant pour l'IL-1 et le TNF $\alpha$ . Or l'IL1 et le TNF $\alpha$  induisent eux-même la synthèse et l'activation du NF $\kappa$ B. Un cercle vicieux peut alors s'installer et conduire à l'activation persistante de la synthèse des PPA [28, 158, 207].

## **II - VALEURS USUELLES ET VARIATIONS EN DEHORS DU CONTEXTE INFLAMMATOIRE**

L'un des principaux critères de définition des marqueurs de l'inflammation stipule que ses variations physiologiques ou pathologiques n'impliquant pas de processus inflammatoire ne doivent pas être supérieures à celles engendrées par l'inflammation. Contrairement aux autres espèces domestiques et à fortiori l'homme, les données concernant ces variations sont très clairsemées chez les bovins.

### **II.1 - FORMULE SANGUINE**

#### **II.1.1 - Valeurs usuelles**

Les valeurs usuelles de la formule sanguine chez les bovins adultes sont rapportées dans le tableau 6

Tableau 6 : valeur usuelles de la formule sanguine chez les bovins adultes, d'après [204].

|                              | Unité              | Valeurs usuelles adultes |
|------------------------------|--------------------|--------------------------|
| Hémoglobine                  | g/100ml            | 80 – 150                 |
| Hématocrite                  | %                  | 24 – 46                  |
| Erythrocytes                 | 10 <sup>9</sup> /l | 5.0 – 10.0               |
| VCM                          | fL                 | 40 – 60                  |
| CMH                          | pg                 | 11.0 – 17.0              |
| CCMH                         | g/l                | 300 – 360                |
| Thrombocytes                 | 10 <sup>9</sup> /l | 100 – 800                |
| Leucocytes                   | 10 <sup>9</sup> /l | 4.0 – 12.0               |
| Neutrophiles (segmentés)     | 10 <sup>9</sup> /l | 0.6 – 4.0                |
| Neutrophiles (non segmentés) | 10 <sup>9</sup> /l | 0 – 0.1                  |
| Lymphocytes                  | 10 <sup>9</sup> /l | 2.0 – 7.5                |
| Monocytes                    | 10 <sup>9</sup> /l | 0 – 0.8                  |
| Eosinophiles                 | 10 <sup>9</sup> /L | 0 – 2.4                  |

## II.1.2 - Variations dues à l'âge et au sexe

La formule sanguine du veau naissant est fortement dépendante de la mise bas. Une hypercortisolémie fœtale précède et initie la mise-bas [5, 256]. Elle induit une leucocytose dont les principales composantes sont une neutrophilie ( $8-10 \times 10^9/L$ ) et une lymphopénie (inférieur à  $3 \times 10^9/L$ ). On observe alors un rapport Neutrophiles : Lymphocytes (N:L) supérieur à 2:1 voire 3:1 qui s'inverse dans les premières semaines de vie en raison de la diminution des neutrophiles circulant et de l'augmentation simultanée des lymphocytes (figure 7) [126]. On observe ensuite une diminution progressive du nombre de lymphocytes qui peut influencer ce rapport chez les bovins âgés (tableau 7) [17].

Chez certains animaux le nombre d'éosinophiles semble aussi varier avec l'âge, passant d'une valeur moyenne de 1.5 % des leucocytes totaux dans les 6 premiers mois, à plus de 10 % chez l'adulte. Des valeurs élevées, allant jusqu'à 3000 cellules/ $\mu L$ , peuvent être observées chez des sujets sains [272].

Tableau 7 : variation des paramètres hématologiques selon l'âge chez des vaches Prim'holstein saines, d'après [126].

| Age       | GR<br>(106/ $\mu l$ ) | Hb<br>(g/l) | Leucocytes<br>( $10^3/\mu L$ ) | Neutrophiles<br>( $10^3/\mu L$ ) | Lymphocytes<br>( $10^3/\mu L$ ) | Monocytes<br>( $10^2/\mu L$ ) | Eosinophiles<br>( $10^2/\mu L$ ) | Basophiles<br>(/ $\mu L$ ) |
|-----------|-----------------------|-------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| 1-6 mois  | 13.10                 | 11.07       | $8.7 \pm 2.5$                  | $3.0 \pm 1.7$                    | $4.6 \pm 1.3$                   | $6.8 \pm 3.7$                 | $1.7 \pm 5.2$                    | $50 \pm 60$                |
| 6-12 mois | 10.65                 | 10.10       | $7.7 \pm 1.8$                  | $0.8 \pm 0.4$                    | $6.3 \pm 1.5$                   | $6.0 \pm 1.7$                 | $0.8 \pm 0.5$                    | 0                          |
| 1-2 ans   | 9.15                  | 10.97       | $9.0 \pm 2.5$                  | $2.3 \pm 1.4$                    | $5.9 \pm 1.6$                   | $4.2 \pm 1.7$                 | $5.0 \pm 3.8$                    | $60 \pm 60$                |
| 2-3 ans   | 7.50                  | 10.70       | $9.4 \pm 1.7$                  | $2.1 \pm 0.9$                    | $5.3 \pm 1.2$                   | $4.7 \pm 2.2$                 | $13.0 \pm 10.0$                  | $70 \pm 100$               |
| 3-4 ans   | 8.7                   | 11.30       | $7.7 \pm 1.9$                  | $1.9 \pm 0.9$                    | $4.6 \pm 1.0$                   | $3.2 \pm 1.5$                 | $9.0 \pm 6.5$                    | $50 \pm 50$                |
| 4-6 ans   | 7.89                  | 11.20       | $7.5 \pm 1.1$                  | $1.8 \pm 0.6$                    | $4.0 \pm 0.8$                   | $4.5 \pm 2.0$                 | $12.0 \pm 7.0$                   | $60 \pm 50$                |
| 6-14 ans  | 7.47                  | 11.10       | $6.9 \pm 2.5$                  | $1.8 \pm 0.9$                    | $4.25 \pm 2.0$                  | $3.5 \pm 2.0$                 | $13.0 \pm 7.0$                   | $20 \pm 30$                |

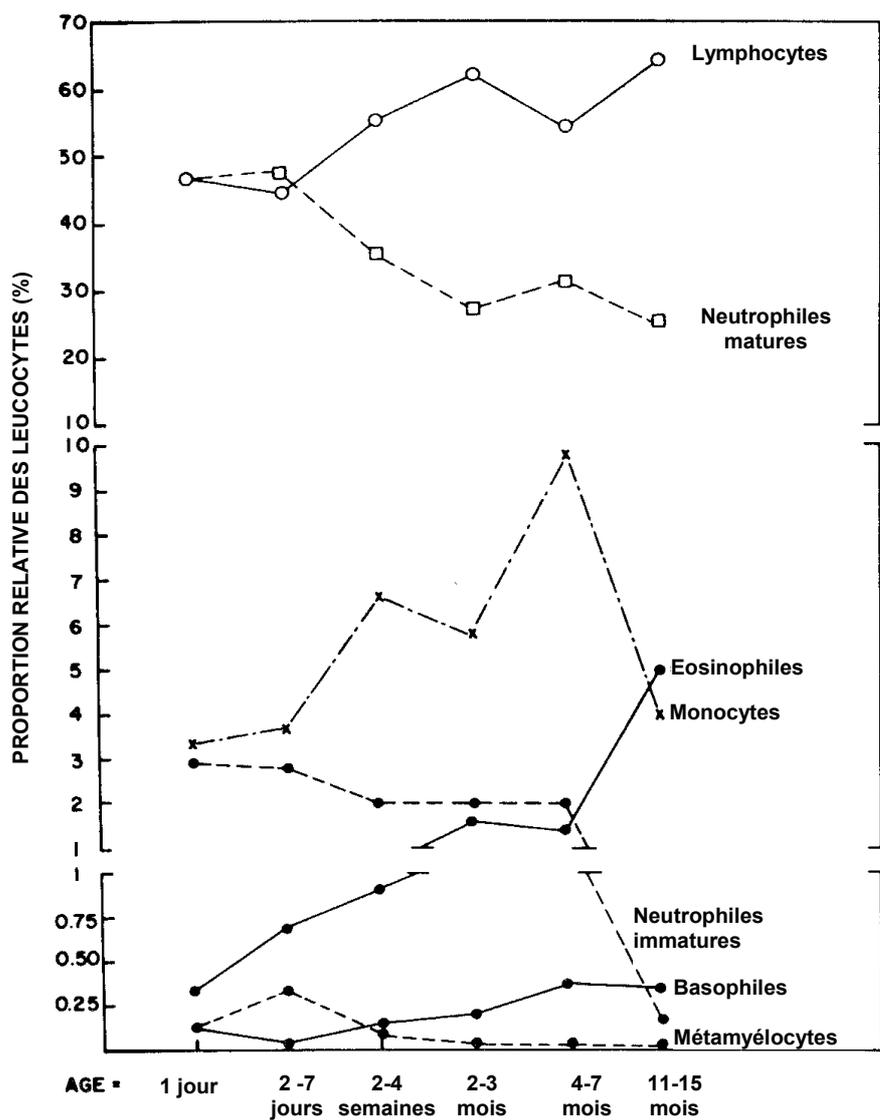


Figure 7 : variation des différentes populations leucocytaires selon l'âge chez les jeunes bovins, d'après [126].

### II.1.3 - Variations dues au stres

Un stress physique (inconfort, transport) ou émotionnel, un effort physique intense sont respectivement responsables d'une leucocytose dite "physiologique" et d'un "leucogramme de stress", par opposition à la leucocytose "réactive" en réponse à l'inflammation ou l'infection [39, 126, 279]. Ces modifications sont sous la dépendance de l'action de l'adrénaline et du cortisol endogène.

Dans le cas de la leucocytose physiologique, l'adrénaline entraîne une splénocontraction et par voie de conséquence une libération d'érythrocytes, ainsi que la démargination des leucocytes (neutrophiles et/ou lymphocytes) des capillaires sanguins. L'augmentation des neutrophiles et des lymphocytes circulants n'excède pas le double des valeurs usuelles maximales et on n'observe généralement pas de granulocytes immatures. Cet effet, éphémère, disparaît généralement dans les 30 minutes suivant la disparition du stimulus [37, 126, 279].

Les modifications résultant de l'hypercortisolémie lors de stress sont beaucoup plus marquées. La démargination des neutrophiles, la diminution de la diapédèse des neutrophiles circulants, et la libération par la moelle osseuse des neutrophiles du pool de stockage provoquent, dans les 4 à 8 heures, une neutrophilie pouvant atteindre 12 000 cellules/ $\mu\text{L}$ , et qui persiste jusqu'à 72 heures après le stress. Cette neutrophilie ne s'accompagne généralement pas de l'apparition de cellules immatures. A l'inverse, la séquestration des lymphocytes dans les tissus lymphoïdes provoque une lymphopénie marquée. Par conséquent, le nombre de leucocytes totaux est rarement augmenté, le plus souvent diminué, et le seul fait marquant est une augmentation importante du rapport neutrophiles / lymphocytes [37, 126, 279] [16]. Ces modifications seront aussi présentes lors de processus pathologiques qui n'impliquent que des réactions inflammatoires modérées : déplacement de la caillette (excepté le volvulus à droite), hypocalcémie puerpérale, dystocie, indigestion simple...). Les caractéristiques des différentes neutrophilies sont résumées dans le tableau 8.

Tableau 8 : caractéristiques des différentes neutrophilies, d'après [169].

| Type de Neutrophilie       | Nombre de lymphocytes | Cellules immatures |
|----------------------------|-----------------------|--------------------|
| Physiologique (adrénaline) | Normal à augmenté     | Absence            |
| Stress (glucocorticoïdes)  | Diminué               | Absence à rares    |
| Inflammation               | Souvent diminué       | Souvent présentes  |

#### **II.1.4 - Variations dues au statut physiologique**

La mise-bas entraîne chez la vache des modifications du leucogramme semblables à celles observées lors de stress : neutrophilie avec ou sans apparition de neutrophiles immatures, et parfois lymphopénie. L'existence d'une monocytose se rapporte dans certains cas de parturitions sans complications [126].

Ces changements sont significatifs dès 12 à 24 heures post-partum et le restent pendant quelques jours.

#### **II.1.5 - Variations iatrogènes**

La réponse à l'injection de corticoïdes est identique à celle observée dans le leucogramme de stress. L'administration intramusculaire de doses croissantes (entre 50 et 500 mg) d'acétate de 9 $\alpha$ - fluoroprednisolone à des vaches laitières entraîne dans les 12 premières heures une neutrophilie, une lymphopénie et une éosinopénie typiques, encore significatives 78 à 84 heures post-injection [126]. Les traitements prolongés peuvent induire des modifications persistante du leucogramme.

### **II.2 - PROTEINES DE LA PHASE AIGUË**

#### **II.2.1 - Valeurs usuelles**

Le tableau 9 regroupe les valeurs usuelles des principales protéines de la phase aiguë chez les bovins adultes. Les effets de l'âge du statut physiologique sont abordés plus loin. Nous avons choisi de reporter ici les références bibliographiques où le nombre d'animaux était le plus important et/ou celles qui donnaient un intervalle de valeurs et non pas uniquement une valeur moyenne.

Tableau 9 : Valeurs usuelles des principales protéines de la phase aiguë chez des bovins sains.

| PPA                 | Unité           | Moyenne<br>± écart type | Intervalle  | nombre<br>d'animaux | Catégories d'âge/race                         | Technique          | Référence |
|---------------------|-----------------|-------------------------|-------------|---------------------|---|--------------------|-----------|
| Hp                  | mg/l            | < 30                    |             | 49                  | 7-9 mois<br>Hereford                          | ELISA direct       | [89]      |
| Hp                  | mg/l            | <20                     |             | 16                  | Vaches Prim'Holstein                          | Biochimique        | [69]      |
| Hp                  | mg/l            | 12 ± 5                  |             | 20                  | Vaches adultes                                | Spectrophotométrie | [245]     |
| Hp                  | mg/l            | 0.35 ± 0.59             |             | 158                 | Tous âges et races Mâles et<br>femelles       | EIA compétition    | [166]     |
| Hp                  | mg/l            | 0.176± 0.193            |             | 86                  | Mâles et femelles adultes                     | EIA compétition    | [165]     |
| Hp                  | mg/l            | < 1                     |             | 26                  | 2- 8 ans<br>Vaches Prim'Holstein              | Immunoblot + ELISA | [179]     |
| Hp                  | mg HbBC / 100ml | 0.18 ± 1.04             |             | 147                 | Bouvillons                                    | ELISA direct       | [216]     |
| Hp                  | mg HbBC / 100ml | 0.28 ± 1.50             |             | 78                  | Vaches  | ELISA direct       | [216]     |
| Hp                  | mg HbBC / 100ml | 6.6 ± 1.0               | 0 – 8.64    | 46                  | Bouvillons et vaches adulte<br>Prim'Holstein  | Biochimique        | [160]     |
| SAA                 | mg/l            | < 8.8                   |             | 82                  | Tous âges et races<br>Mâles et femelles       | ELISA indirect     | [119]     |
| SAA                 | mg/l            | 5.1                     | 3.6 - 11.0  | 16                  | Vaches Prim'Holstein                          | ELISA indirect     | [69]      |
| α <sub>1</sub> -AGP | g/l             | 0.27 ± 0.1              | 0.16 – 0.55 | 53                  | 1 mois à 12 ans                               | SRID               | [124]     |
| α <sub>1</sub> -AGP | g/l             |                         | 0.2 - 0.45  | 82                  | Tous âges et races<br>Mâles et femelles       | SRID               | [119]     |
| α <sub>1</sub> -AGP | g/l             | 0.31                    | 0.2 - 1.04  | 16                  | Vaches Prim'Holstein                          | SRID               | [69]      |
| α <sub>1</sub> -AGP | g/l             | 0.29 ± 0.08             | 0.31-0.48   | 166                 | Tous âges, mâles et femelles<br>Prim'Holstein | SRID               | [255]     |
| Fibrinogène         | g/l             | 4.8 ± 1.0               |             | 202                 | Tous âges et races<br>Mâles et femelles       | Précipitation      | [254]     |
| Fibrinogène         | g/l             | 5.5 ± 1.2               | 3.4 – 7.8   | 75                  | Vaches 2 à 8 ans                              | Précipitation      | [70]      |

Les valeurs rapportées pour l'**haptoglobine** sont très variables selon les études. Dans certaines études utilisant des techniques très sensibles comme l'immunoblot ou l'ELISA compétition, des valeurs inférieures à 1 mg/l sont rapportées [165, 179]. Les techniques biochimiques ou immunochimiques utilisables en routine pour l'analyse d'un grand nombre de prélèvements ont généralement un seuil de détection de l'ordre de 10 à 50 mg/l. Pour certaines études, les concentrations plasmatiques en haptoglobine chez les bovins cliniquement sains peuvent atteindre 350 mg/l [119]. Cependant la bonne santé de ces animaux n'est pas clairement démontrée [216]. Les valeurs de 50 à 100 mg/l (0.05 à 0.1 g/l) sont considérées par plusieurs auteurs comme la borne supérieure des valeurs usuelles [62, 119, 245]. Ces valeurs sont très inférieures à celle observées chez l'homme (0.6 à 1.8 g/l) et les carnivores domestiques (chien et chat : 0.5 à 2.1 g/l) [65, 74, 96, 155].

Pour la SAA, les valeurs usuelles sont inférieures à 10 mg/l.

Pour l' $\alpha_1$ -AGP les valeurs usuelles sont comprises entre 0.1 et 0.55 g/l.

Pour le fibinogène les valeurs usuelles sont comprises entre 2 et 7 g/l.

Les valeurs usuelles des autres protéines de la phase aiguë ne sont pas clairement établies, soit en raison du faible nombre d'études et d'animaux prélevés ( $\alpha_1$ -ACT,  $\alpha_2$ -Macroglobuline) soit parce que les valeurs obtenues sont fortement dépendantes des techniques utilisées (céruleoplasmine).

## **II.2.2 - Variations dues à l'âge et au sexe**

Chez le veau, les gammaglobulines, et par voie de conséquence les protéines totales sont fortement dépendantes de l'absorption colostrale. On considère ainsi qu'une prise colostrale correcte s'accompagne d'une concentration en protéines totales supérieure à 50 g/l, alors qu'en dessous de 45 g/l le transfert de l'immunité colostrale est jugé insuffisant [193]. Les immunoglobulines absorbées subissent ensuite une dégradation, tandis que l'organisme produit activement ses propres anticorps. Sur une période, variable selon les individus, de quelques semaines les IgG sériques déclinent, suite à un catabolisme plus important que la synthèse.

Contrairement aux paramètres hématologiques, et en dehors d'infection *in utero*, les

concentrations plasmatiques de la SAA et de l'haptoglobine chez le veau ne semblent pas être affectées par la naissance. L'hypercortisolémie prénatale ne semble pas induire pas de variation [3, 5]. Contrairement à ce qui est observé chez l'homme [200], les valeurs moyennes de SAA chez les veaux à la naissance sont inférieures à celles observées chez l'adulte.

En cas d'infection ou de traumatisme en période néonatale, la synthèse hépatique de la SAA semble possible dès les premières heures de vie, tandis que celle de l'haptoglobine ne serait effective qu'après quatre, ou cinq jours [3]. Ces résultats s'accordent avec ceux connus depuis longtemps chez le nourrisson, chez qui la concentration se normalise vers l'âge de six mois [74]. Ces remarques doivent cependant être confrontées aux différences de cinétique précoce entre ces deux molécules (voir page 91 et suivantes).

A partir d'un mois d'âge on ne note pas de variation significative concernant l'haptoglobine [213], l' $\alpha_1$ -AGP [124, 255] et la SAA, ni d'effet sexe.

Le fibrinogène augmente progressivement chez les jeunes bovins jusqu'à l'âge de deux an et demi [70, 167]. Les concentrations plasmatiques en fibrinogène sont significativement plus faible chez le veau par rapport à l'adulte : des valeurs moyenne de  $2.85 \pm 1.45$  g/l à  $3.80 \pm 1.13$  g/l sont rapportées pour des veaux de 24 heures à 5 semaines d'âge [204, 268].

Comme chez l'homme, la concentration de la céruloplasmine diminue de sérique avec l'âge. Entre 3 mois et 5 mois d'âge, Conner *et al.* (1988)[41] notent une diminution de 20 % en moyenne sur 4 veaux.

### **II.2.3 - Variations dues au stress**

Le mode d'action du stress comme élément inducteur de la synthèse et la libération des protéines de la phase aiguë n'est à l'heure actuelle que mal connu chez les bovins. En effet les études réalisées mettent en évidence de profondes différences entre l'espèce bovine et le chien, le lapin, ou le rat.

Cependant, les résultats obtenus *in vivo* montrent que certaines PPA sont sensibles au stress. Ainsi une augmentation significative de l'haptoglobine est notée après le transport de taurillons pendant 48 h, alors que les concentrations de l' $\alpha_1$ -AGP ne sont pas affectées [177]. Une nouvelle augmentation significative de l'haptoglobine est notée le lendemain du

déchargement des animaux. Les valeurs obtenues suite à cette épreuve de stress sont en dehors de valeurs usuelles ( $26.5 \pm 14,1$  mg HbBC/100ml, valeurs usuelles  $< 10$  mg HbBC/100ml).

De même, la teneur plasmatique en fibrinogène n'est pas affectée par une épreuve de stress de courte durée (transport de taurillons sur 160 kilomètres), tandis qu'une augmentation significative est observée lorsque le trajet est de 400 kilomètres [196]. Les valeurs mesurées restent cependant dans les valeurs usuelles.

Les concentrations plasmatiques de l'Hp et de la SAA ont été mesurées pour deux lots de veaux élevés dans des conditions différentes de logement (une des deux situations étant établie comme stressante par des mesures de durée de sommeil, de prise alimentaire et de station debout *versus* couchée) [3]. La SAA augmente nettement pour le lot en situation stressante ( $17.9 \pm 1.8$  mg/l *versus*  $2.8 \pm 0.9$  mg/l ;  $p < 0.001$ ). Cette augmentation n'est cependant pas significative par rapport aux valeurs usuelles supérieures.

Par ailleurs, aucune augmentation de la cortisolémie n'est mise en évidence. Ceci pourrait remettre en cause le rôle du cortisol endogène dans l'induction des PPA sous l'effet du stress.

Chez le veau, l'injection d'ACTH longue action entraîne une augmentation considérable de la cortisolémie pendant 10 heures sans que les concentrations du fibrinogène ne soient affectées, à la différence de ce qui est observé chez le lapin [82]. De même la synthèse hépatique de la SAA ne semble pas être sensible à l'action de l'ACTH [267].

Ainsi, malgré l'action des corticoïdes sur la synthèse hépatocytaire des PPA, il semble que l'hypercortisolémie mesurée lors du stress ne soit pas directement à l'origine de l'augmentation des certains de ces marqueurs observée *in vivo*.

#### **II.2.4 - Variations dues au statut physiologique**

Chez la femme, pendant la grossesse, les œstrogènes augmentent la synthèse hépatique du fibrinogène, de la céruloplasmine de l' $\alpha_1$ -PI et diminuent celle de l'haptoglobine et de l' $\alpha_1$ -AGP [96].

Chez les bovins les données concernant l'effet de la gestation sont très limitées.

La concentration de l'haptoglobine [213] et de l' $\alpha_1$ -AGP [124] ne semblent pas être influencées par la gestation.

Le fibrinogène augmente sensiblement en fin de gestation (9<sup>e</sup> mois) (4.33 à 8.61 g/l, moyenne  $5.85 \pm 1.15$  g/l) [70].

Les protéines totales, les  $\gamma_1$  et  $\beta_2$  globulines commencent d'augmenter 2 mois avant le terme, sont maximales 1 mois *ante-partum*, et diminuent rapidement dans le dernier mois, en relation avec la colostrogénèse [135].

En revanche les concentrations de Hp et de SAA semblent influencées par la mise bas.

La SAA augmente dans les 24 h suivant la mise bas chez la vache parturiente, pour atteindre un maximum 48 heures *post-partum*, tandis que les concentrations restent inchangées chez le fœtus [5]. Les teneurs plasmatiques maternelles restent élevées jusqu'à 96 heures après la mise-bas. Ces résultats sont comparables à ceux observés chez la femme au moment de l'accouchement.

Dans une autre étude, les concentrations moyennes de SAA sont de 32 mg/l (comprises entre 25 et 45 mg/l) 48 heures *post-partum* contre 8 mg/l en moyenne 4 heures *ante-partum* [145].

L'haptoglobine est détectée chez 31 vaches sur 42 après la mise bas de 30 à 970 mg/l, alors que la concentration reste à un niveau indécélable chez 38/42 entre 21 et 9 jours avant terme [263].

Chez 8 brebis dont l'agnelage s'est bien déroulé et chez qui l'absence de métrite *post-partum* est vérifié par bactériologie sur écouvillon génital, la concentration en haptoglobine est significativement augmentée le jour de la mise bas ( $p < 0.05$ ), maximale à 24 h ( $p < 0.001$ ) et décroît rapidement dès le 3<sup>e</sup> jour. Au 7<sup>e</sup> jour, les concentrations retournent au niveau *ante-partum* [211]. Les concentrations en  $\alpha_1$ -AGP restent inchangées autour de la mise-bas chez les 8 brebis du groupe témoin et varient entre 0.40 et 0.63 g/l entre -5 jours et +42 jours.

Ces données suggèrent une augmentation de la synthèse de certaines protéines de la phase aiguë (SAA et haptoglobine en particulier) en association avec la mise-bas. Il est difficile de distinguer le rôle des facteurs endocriniens et du traumatisme tissulaire important associé à la mise-bas [5]. Cependant les concentrations d'haptoglobine sérique *ante-partum*

de 12 brebis dystociques (insuffisance de dilatation du col utérin) (moyenne 240 mg/l, extrêmes entre 70 et 650 mg/l) et de 9 brebis agnelant sans problèmes (moyenne 250 mg/l, extrêmes entre 20 et 890 g/l) étaient significativement supérieures à celles de brebis non gravides (moyenne 50 mg/l, extrêmes entre 10 et 520 g/l) [227].

Il semblerait que cette augmentation de l'haptoglobine coïnciderait avec la sécrétion endogène de prostaglandine  $\text{PGF}_{2\alpha}$  qui initie la lutéolyse. L'injection de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  est suivie d'un accroissement de la concentration d'haptoglobine [240].

L'haptoglobine et la SAA augmenteraient de façon physiologique dans les derniers jours de la gestation, à partir de 8-9 jours avant mise-bas pour l'haptoglobine et 24-48 heures pour la SAA, indépendamment des lésions engendrées par l'expulsion du fœtus [5, 263].

### **II.2.5 - Variations iatrogènes et alimentaires**

Chez les bovins comme chez l'homme, les glucocorticoïdes induisent la synthèse et la libération de protéines de la phase aiguë par des cellules hépatiques, *in vitro* [106, 179]. Des résultats similaires sont rapportés *in vivo* par l'injection de dexaméthasone (phosphate sodique, 0.1 mg/kg, IV, une fois) [288].

Les concentrations d'haptoglobine obtenues suite à ces traitements sont comprises entre 0.2 et 0.4 g/l.

Chez les bovins carencés en cuivre sur de longues périodes (cuprémie inférieure à 5.6  $\mu\text{mol/l}$ ), les activités enzymatiques de la céruloplasmine sont réduites, pouvant être divisées par deux [32].

## II.3 - LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN (LCR)

### II.3.1 - Valeurs usuelles et variations dues à l'âge

Les valeurs des tableau 10 et 11 ont été obtenues à partir de 16 bovins âgés de plus de 2 ans de races laitières (n=11) ou allaitantes (n= 5) [273].

Tableau 10 : moyenne, écart-type, et intervalle des valeurs des protéines du LCR de 16 bovins adultes, d'après [273].

|            | PT<br>(g/l) | Albumine<br>(g/l) | Globulines (électrophorèse) |               |                |              |
|------------|-------------|-------------------|-----------------------------|---------------|----------------|--------------|
|            |             |                   | Alpha<br>(g/l)              | Beta<br>(g/l) | Gamma<br>(g/l) | IgG<br>(g/l) |
| Moyenne    | 0.39        | 0.15              | 0.14                        | 0.03          | 0.04           | 0.09         |
| Ecart type | 0.033       | 0.015             | 0.011                       | 0.004         | 0.004          | 0.010        |
| Intervalle | 0.23 - 0.66 | 0.08 - 0.28       | 0.09 - 0.24                 | 0.01 - 0.08   | 0.02 - 0.09    | 0.05 - 0.16  |

Tableau 11 : moyenne, écart-type et intervalle des composantes cellulaires (leucocytes) du LCR de 16 bovins adultes, d'après [273].

|            | TOTAL<br>(cell./ $\mu$ l) | Neutrophiles<br>(cell./ $\mu$ l) | Monocytes<br>(cell./ $\mu$ l) | Lymphocytes<br>(cell./ $\mu$ l) | Eosinophiles<br>(cell./ $\mu$ l) |
|------------|---------------------------|----------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Moyenne    | 2.88                      | 0.03                             | 0.25                          | 1.46                            | 0                                |
| Ecart-type | 0.62                      | 0.01                             | 0.09                          | 0.59                            | 0                                |
| Intervalle | 0 - 9                     | 0 - 0.18                         | 0 - 1.33                      | 0 - 8.10                        | 0                                |

Les résultats présentés sont semblables à ceux fournis par d'autres études [128, 233].

Chez les veaux ou jeunes bovins, quelques différences semblent exister : Protéines totales de 0.15 g/l [0.01-0.33 g/l] [183, 253] à 0.28 g/l [0.06 à 0.38 g/l] [229] et leucocytes de 7 [183, 253] à 100 cellules/ $\mu$ l [12-250] [234].

En dehors d'un processus inflammatoire siégeant dans la moelle épinière (abcès, tumeur, trauma) il ne semble pas qu'il y ait de différence entre le LCR obtenu par ponction atlanto-occipitale et lombo-sacrée [231, 232] pour les atteintes communes du système nerveux central.

Explorées de façon récente chez l'homme [34, 185, 192, 241, 242], les concentrations des protéines de la phase aiguë, en particulier la SAA, l'haptoglobine, la céruloplasmine et l' $\alpha_1$ -AGP, n'ont pas encore été étudiées chez les bovins (Eckersall, communication personnelle).

## II.4 - PARAMETRES DU LAIT

### II.4.1 - Valeurs usuelles et variations dues à l'âge

Plusieurs auteurs ont rapporté une augmentation du CCS avec l'âge. Cependant la prévalence plus élevée des mammites chez les vaches âgées semble être la cause principale de cette variation [57, 99]. En effet, si les analyses sont effectuées uniquement chez des vaches saines, et non plus sur l'ensemble de la population, l'augmentation est minime voire nulle (tableau 12). La réponse cellulaire aux pathogènes mineurs et majeurs est plus marquée à mesure que l'âge avance [238]. Plusieurs explications ont été avancées à cela : nombre de quartiers atteints plus élevé, destruction tissulaire plus importante lors de mammité évoluant longtemps, et une réponse plus marquée sur les quartiers précédemment infectés.

Tableau 12 : CCS moyen suivant l'âge et le statut infectieux des vaches, d'après [99].

| Age<br>(Années) | Moyenne<br>(10 <sup>3</sup> /ml) | Statut infectieux |            |            |
|-----------------|----------------------------------|-------------------|------------|------------|
|                 |                                  | Sains             | P. Mineurs | P. majeurs |
| 2               | 232                              | 126               | 190        | 614        |
| 3               | 314                              | 149               | 218        | 661        |
| 4               | 390                              | 148               | 233        | 753        |
| 5               | 564                              | 180               | 308        | 977        |
| 6               | 544                              | 194               | 322        | 880        |
| 7               | 654                              | 251               | 320        | 986        |
| > 7             | 868                              | 113               | 519        | 1207       |

Les autres paramètres du lait qui nous intéressent ici (albumine,  $\alpha_1$ -AT, SAA et haptoglobine) ne semblent pas varier en fonction de l'âge.

#### **II.4.2 - Variations dues au stress**

De nombreuses études ont été menées afin de mettre en évidence une augmentation du comptage cellulaire du lait sous l'effet du stress. Les résultats sont très contradictoires selon les modèles utilisés *in vivo* [57, 99, 271]. L'injection d'ACTH ou de corticoïdes n'entraîne que peu ou pas de modification chez la vache saine [191].

Le stress n'est pas à l'heure actuelle retenu comme un des facteurs majeurs de variation non pathologique des CCS. Il ne semble pas affecter les autres paramètres locaux de l'inflammation non plus.

#### **II.4.3 - Variations dues au statut physiologique**

##### a) Comptage des cellules somatiques

Le nombre de leucocytes présents dans le lait en l'absence de mammite est plus élevé dans les cinq premiers jours à deux semaines, voire 35 jours, après le vêlage [57, 189]. Selon Dohoo (1993) [55] 55% des primipares et 60 % des multipares ont des comptages des cellules somatiques élevés (supérieurs à 200 000 cellules/ ml) dans les 6 premiers jours post-partum. La proportion à 28 jours post-partum est de 10% pour les primipares et de 20% pour les multipares. En l'absence d'infection, le CCS doit être inférieur à 300 000 cellules/ml cinq jours post-partum [212]. L'interprétation du comptage cellulaire doit donc être prudente durant les 9 à 11 premiers jours de la lactation [55]. Dans une étude récente, le CCS des quartiers non infectés chute en dessous de 50 000 cellules/ml dès le troisième jour (6<sup>e</sup> traite) [13] (figure 8). A mesure que la lactation avance, les valeurs moyennes du CCS semblent augmenter par un simple effet de concentration au fur et à mesure que la quantité de lait produite diminue.

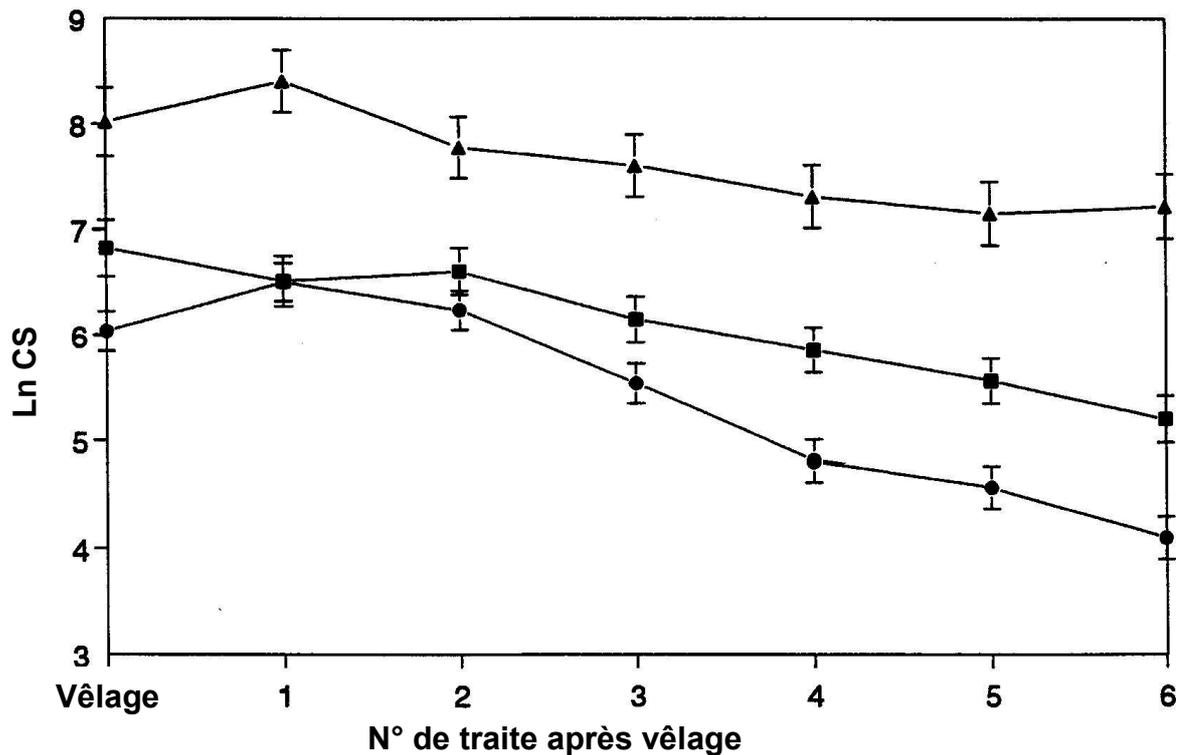


Figure 8 : suivi des CCS moyens des quartiers non-infectés (●), infectés par des pathogènes mineurs (■) et infectés par des pathogènes majeurs (▲), en fonction du numéro de traite post-partum, d'après [13].

Une augmentation du CCS est ainsi classiquement observée en fin de lactation. L'augmentation de la sensibilité de la mamelle aux infections durant la période précédant le tarissement a été mise en cause. Cependant, des analyses effectuées sur des vaches saines ont montré que cette augmentation existait même en dehors du contexte infectieux [57]. Plusieurs facteurs ont été avancés pour expliquer ce phénomène. La fin de lactation correspond au phénomène d'involution du parenchyme mammaire, avec l'expulsion d'un grand nombre de cellules dans le lait [276]. Un effet dilution joue également : le comptage cellulaire devient significativement plus élevé quand la production laitière quotidienne descend en dessous de 4 litres [23]. Aucune différence significative n'apparaît entre les différentes classes d'âge chez les vaches saines, sauf en fin de lactation (tableau 13).

Tableau 13 : Comptage de cellules somatiques suivant le stade de lactation et le statut infectieux des vaches, d'après [99]

| Stade de lactation (jours) | Moyenne ( $10^3/\text{ml}$ ) | Statut infectieux |            |            |
|----------------------------|------------------------------|-------------------|------------|------------|
|                            |                              | Sains             | P. Mineurs | P. majeurs |
| 0-49                       | 380                          | 247               | 247        | 839        |
| 50-99                      | 429                          | 138               | 286        | 861        |
| 100-149                    | 498                          | 125               | 240        | 1068       |
| 150-199                    | 399                          | 126               | 295        | 735        |
| 200-249                    | 452                          | 208               | 240        | 902        |
| 250-299                    | 445                          | 139               | 267        | 758        |
| >300                       | 634                          | 165               | 374        | 1031       |

De plus si le CCS est en moyenne 260 000 cellules/ml pour un quartier sain et n'ayant pas d'historique de mammite, il peut atteindre 600 000 cellules/ml pour un quartier sain mais ayant eu une mammite plusieurs jours voire plusieurs semaines auparavant [57]. La persistance d'un comptage cellulaire élevé longtemps après la guérison bactériologique pourrait donc influencer l'interprétation de CCS élevés.

Le comptage cellulaire du lait est sensible à d'autres facteurs (saisons, variations nyctémérales, machine à traire...) mais étant donné leur faible impact, nous avons choisi de ne pas les développer ici (pour revue voir [99]).

#### b) Albumine et protéines de la phase aiguë

Diverses études menées sur l'ensemble de la lactation de vaches bactériologiquement saines ont montré que les concentrations en albumine et antitrypsine ( $\alpha_1$ -AT) sont plus élevées pendant les 6 à 10 premiers jours de la lactation (augmentation d'un facteur 18 pour l'activité antitrypsique et 3 pour l'albumine) [116, 189, 238]. Ceci pourrait être expliqué par la plus grande perméabilité vasculaire dans la mamelle pendant la période péri-partum. La forte activité antitrypsique du colostrum, qui jouerait un rôle dans la protection des immunoglobulines colostrales vis à vis des enzymes digestives du veau, est aussi à l'origine des concentrations importantes en  $\alpha_1$ -AT observées en début de lactation [116, 161].

Au-delà de 10 jours post-partum, les concentrations de l'albumine et de l' $\alpha_1$ - antitrypsine restent inchangées pendant le reste de la lactation.

Les variations au cours de la lactation des principales protéines de la phase aiguë (SAA, haptoglobine,  $\alpha_1$ -AGP) n'ont pas été explorées dans le lait.

## **II.5 - LIQUIDE DE PONCTION ABDOMINALE**

Tableau 14 : caractéristiques macroscopiques et cytologiques du liquide péritonéal normal, d'après [9, 147]).

| <b>Paramètres</b>                        | <b>Valeurs usuelles</b>   | <b>Facteurs de variation physiologique</b>  |
|--|---------------------------|---|
| Couleur                                  | translucide à jaunâtre    | Légèrement rosé en fin de gestation   |
| Odeur                                    | aucune                    |   |
| Turbidité                                | absence à légère          |   |
| Volume                                   | 0 à 5 ml par prélèvement  | augmenté en fin de gestation et lors d'insuffisance cardiaque congestive                |
| Protéines Totales (g/l)                  | 10 – 31<br>Ne coagule pas | Peu ou pas modifié  |
| Cellules Nucléées ( $10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.3 – 10                  | augmenté dans les 2 semaines post-partum avec neutrophiles et éosinophiles prédominants |
| Neutrophiles                             | < 40 – 60 %               |   |
| Eosinophiles                             | Quelques %                |   |
| Monocytes / macrophages                  | 10 – 60 %                 |   |
| Ratio Neutrophiles / Mononucléaires      | 1: 1                      |   |

## **II.6 - FACTEURS PATHOGENES INTERFERANT AVEC L'EVALUATION MARQUEURS DE L'INFLAMMATION**

Dans ce dernier chapitre, nous traiterons de certaines maladies souvent associées à des modifications des paramètres qui nous intéressent ici mais qui n'ont pas de composante inflammatoire patente.

### **II.6.1 - Déshydratation**

Les concentrations des différents marqueurs de l'inflammation sont dépendantes de l'état d'hydratation de l'animal. La déshydratation se caractérise par une panhyperprotéïnémie, par opposition aux hyperprotéïnémies liées aux hyperglobulinémies. Ce phénomène

d'hémoconcentration affecte aussi bien les paramètres hématologiques que protéiques [256].

Une correction de l'effet de la déshydratation peut être obtenue pour le fibrinogène et les protéines plasmatiques et sériques totales. Plusieurs auteurs préconisent le calcul du ratio protéines sériques / fibrinogène [(=Protéines Plasmatiques- fibrinogène)/fibrinogène] afin de différencier les hyperfibrinogénémie liées à une déshydratation (rapport supérieur à 10:1 ou 15:1) et celles liées à la réponse inflammatoire (rapport inférieur à 8:1 ou 10:1) [111, 220, 254]. Chez le veau sain, en raison d'une teneur plasmatique en fibrinogène plus faible, ce rapport est de 12:1 [38, 223]. L'appréciation de l'augmentation des protéines plasmatiques chez un animal déshydraté peut se faire en utilisant le ratio albumine : globulines (valeurs usuelles 0.84-0.94) [111]. l'interprétation de ce ratio doit cependant prendre en compte les variations physiologiques et/ou pathologiques de l'albumine, autres que celle induite par l'inflammation.

L'influence de la déshydratation sur la mesure des autres protéines de la phase aiguë n'est pas connue chez les bovins.

### **II.6.2 - Jeûne, cétose et stéatose hépatique.**

Sur 8 vaches n'ayant pas été nourries pendant 48 heures la concentration plasmatique d'haptoglobine était significativement plus élevée que celle du groupe témoin (entre 180 et 400 mg/l *versus* < 25 mg/l (P<0.05) [288].

Sur 4 vaches naturellement atteintes de stéatose hépatique et sur 30 autres non atteintes (la stéatose étant objectivée par la mesure des triglycérides hépatiques) la concentration plasmatique d'haptoglobine était de  $466 \pm 147$  mg/l pour les 4 vaches malades et inférieures au seuil de détection de la technique utilisée (<10µg/l) pour les vaches saines [179].

D'autres études rapportent des résultats similaires, suite à des atteintes naturelles [287] ou induites par l'injection de dexaméthasone (phosphate sodique, 0.1 mg/kg, IV, une fois) associé à deux jours de jeûne [288] où par l'administration d'éthionine (analogue de la méthionine, 25 mg/kg, IV, 2 fois) [264].

Il semble donc qu'il faille tenir compte de cette interférence lors de l'évaluation des concentration en haptoglobine.

Une éosinophilie peut-être observée lors d'amaigrissement marqué et prolongé chez les bovins.

### **II.6.3 - Atteintes rénales**

L'intensité des pertes protéiques dépend de la nature (glomérulaire et/ou tubulaire) et de la sévérité de la lésion. Les premières protéines concernées lors de lésions glomérulaires sont, en raison de leur faible poids moléculaire, l'albumine et les  $\alpha$ -globulines. Les  $\beta$ - et  $\gamma$ -globulines ne sont retrouvées dans l'urine que lorsque les dommages sont plus importants.

La protéinurie massive consécutive aux glomérulopathies chroniques se traduit donc par une hypoprotéinémie d'abord due à la perte d'albumine (hypoalbuminémie), puis à celle des globulines (panhypoprotéinémie). En revanche, des teneurs élevées en fibrinogène peuvent être observées lors de glomérulonéphrite aiguë [38]. Dans certains cas de pyélonéphrite, l'hypergammaglobulinémie provoque une augmentation des protéines sériques totales.

L'amyloïdose, bien que pouvant concerner d'autres organes (foie, rate), est le plus souvent rénale chez les bovins. La forme immune, rare, est associée à de myélomes ou d'autres tumeurs des tissus lymphoïdes. D'un point de vue biochimique, elle se caractérise par le dépôt de protéine amyloïde L, résultant de la digestion protéolytique des chaînes légères des immunoglobulines [260]. La forme réactive est, elle, liée à un phénomène suppuré chronique (mammites, péricardite traumatique, abcès...). Dans ce cas, la digestion protéolytique partielle de la SAA conduit à la protéine amyloïde A, qui se dépose dans les glomérules [121, 275]. Bien que très peu documentées chez les bovins, les conséquences de cette maladie sur les protéines de la phase aiguë semblent être dominées par une augmentation de la teneur plasmatique de la SAA dans le cas de l'amyloïdose réactive [207], une diminution de l' $\alpha_1$ -AGP, et une hyperfibrinogénémie [124, 204]. Une hypoprotéinémie avec hypoalbuminémie et hyperglobulinémie est aussi de règle.

Chez l'homme, le syndrome néphrotique conduit à la diminution des protéines totales (hypoalbuminémie), de l' $\alpha_1$ -AGP et à l'augmentation sérique de l'haptoglobine du fibrinogène, de l' $\alpha$ -1 PI et de la céruloplasmine [96].

#### II.6.4 - Atteintes intestinales

Toute entérite est associée à un phénomène inflammatoire, qu'il soit mécanique – irritation ou destruction de la barrière épithéliale – ou lié à une stimulation antigénique.

Les pertes protéiques excessives et/ou la diminution de l'absorption des protéines alimentaires peuvent être à l'origine d'hypoprotéïnémies marquées lors d'affections chroniques chez les adultes, ou lors de diarrhée aiguë chez le veau [126]. Mc Sherry *et al.* [167] rapportent des valeurs élevées en fibrinogène lors d'entérite chez des bovins adultes (moyenne 9.8 g/l ; [8.4 – 12.2], n=7), sans que les causes soient précisées.

La paratuberculose, caractérisée d'un point de vue lésionnel par une entérite granulomateuse, est associée à des hypoprotéïnémies sévères en fin d'évolution dues à des pertes protéiques, principalement d'albumine, et à une malabsorption [278]. Une concentration normale en protéines totales peut cependant être observée pendant une longue partie de la maladie, en raison de l'hypergammaglobulinémie liée à la réponse immunitaire [126]. Une augmentation légère de l' $\alpha_1$ -AGP a été rapportée lors de paratuberculose avancée [119]. La production élevée d'ARNm codant pour les cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$  dans les tissus intestinaux de moutons infectés par *Mycobacterium paratuberculosis*, pourrait être à l'origine de la synthèse des PPA associées à la maladie [8]. Chez l'homme, l' $\alpha_1$ -AGP, la CRP et la SAA se sont montrées utiles dans le diagnostic et le suivi clinique de la maladie de Crohn, qui s'apparente à la paratuberculose bovine [259].

D'autres atteintes intestinales, beaucoup plus rares, sont à l'origine d'une modification des paramètres hématologiques et/ou biochimiques. Les entérites éosinophiliques, par exemple, peuvent se traduire par une neutrophilie et une monocytose, rarement une éosinophilie. Dans certains cas, une hyperfibrinogénémie et une hyperprotéïnémie ont été observées [31].

Lors de lymphangiectasie, observée dans la paratuberculose, l'obstruction des vaisseaux lymphatiques se traduit par une perte de protéines, de lipides et de chyle dans le tractus digestif. Une lymphopénie est fréquemment associée, sans doute en raison de l'interruption de la recirculation des lymphocytes dans le sang périphérique et de la perte du chyle, riche en lymphocytes [126].

Enfin, certaines atteintes tumorales du tractus digestif (lymphosarcome et adénocarcinome gastrique ou intestinal) peuvent être à l'origine de pertes protéiques excessives, avec pour résultat une élimination des protéines totales sériques ou à une simple hypoalbuminémie.

### **II.6.5 - Atteintes hépatiques**

Lors de cirrhose, d'hépatite bactérienne ou de carcinome, l'atteinte du parenchyme hépatique peut conduire à une diminution de la synthèse d'albumine. La réaction inflammatoire spécifique est à l'origine d'une élévation des  $\gamma$ -globulines. Ces phénomènes ne sont cependant observés que lors de phénomène chronique et lors d'atteinte massive du foie [135].

### **II.6.6 - Parasitisme**

Les nématodes intestinaux et gastriques tels que *Trichosrongylus spp.*, *Cooperia spp.*, *Haemonchus spp.*, *Ostertagia spp.* et *Oesophagostomum spp.* ont une action spoliatrice, provoquent une diminution de l'appétit lors d'infestations massives, et une malabsorption. Les mécanismes conduisent à une hypoprotéïnémie plus ou moins marquée.

Lors d'infestation hépatique massive par *Fasciola hepatica*, une hypoalbuminémie et une anémie hypochrome, parfois sévères peuvent être observées. La concentration sériques des protéines totales peut toutefois rester dans les valeurs usuelles, en raison d'une hypergammaglobulinémie. Les protéines totales plasmatiques chutent parfois à 40 à 50 g/l, avec une hypoalbuminémie marquée .

Les protéines de la phase aiguë ne semblent pas être affectées par le parasitisme. Aucune augmentation significative de l'haptoglobine n'a été observée pendant 23 jours suite à l'infestation expérimentale de 19 veaux par 250 000 larves d'*Ostertagia ostertagi* de stade III [42].

Les infestations parasitaires massives sont souvent associées à une neutrophilie, qui peut être marquée [279].

## **II.6.7 - Maladies systémiques**

Chez les bovins de race Prim'Holstein atteints de Déficit d'Adhésion Leucocytaire des Bovins ou BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency), déficit génétique de synthèse des intégrines  $\beta_2$ , la neutrophilie est sévère, avec ou sans apparition de cellules immatures. Une augmentation du nombre des monocytes circulants peut être présente. Anémie non régénérative et hyperglobulinémie ne sont pas rares. L'augmentation plasmatique des différentes protéines de la phase aiguë est à relier aux atteintes infectieuses intercurrentes dont ces animaux sont souvent victimes.

Chez les bovins atteints de Leucose Bovine Enzootique, une lymphocytose persistante est fréquemment (50% des cas) observée . De 20 à 40 % des animaux développent une anémie normocytaire normochrome comparable à celle observée lors d'inflammation chronique [257]. Une hypoprotéinémie dont les principales composantes sont une hypoalbuminémie sévère et une hyperglobulinémie ( $\alpha_1$ - et  $\alpha_2$ -globulines) a été rapportée par plusieurs auteurs [126, 151].

Chez les animaux atteints de lymphosarcome une élévation du fibrinogène est fréquente, les valeurs pouvant atteindre 12g/l (observations personnelles).

## CONCLUSIONS

Les valeurs usuelles sont établies pour des bovins adultes sains. L'interprétation du bilan inflammatoire doit donc tenir compte des différents facteurs susceptibles de faire varier les paramètres mesurés en dehors des intervalles de référence.

Le bilan hématologique et le profil des protéines de la phase aiguë sont fortement dépendants :

- de l'âge : formule sanguine évoluant de la naissance à l'âge adulte, synthèse de l'haptoglobine absente à réduite chez le veau nouveau né, hypofibrinogénémie chez les jeunes bovins....
- du statut physiologique : faible variation pendant la gestation mais profil de type inflammatoire aigu en péri-partum...
- du stress ou de l'injection de corticoïdes : modification importante de la formule sanguine, augmentation variable des PPA
- et de diverses maladies intercurrentes : modifications variables mais importantes des protéines totales sériques, rendant très utile l'évaluation séparée de l'albumine et des immunoglobulines ; impact variable selon les cas sur les PPA et les paramètres hématologiques.

### **III - VARIATIONS LORS DE REACTION INFLAMMATOIRE**

#### **III.1 - CINETIQUES DE VARIATION**

##### **III.1.1 - Cinétique de variation des paramètres hématologiques**

###### a) Phase précoce (figure 9)

La neutrophilie provoquée par le stress de la réaction inflammatoire est masquée par les modifications associées à la phase inflammatoire précoce [37].

Dans les toutes premières heures, la migration des neutrophiles vers le site inflammatoire, ainsi que leur destruction massive dans les tissus lésés conduit classiquement à une neutropénie marquée [24, 51, 127, 221, 256]. Sous l'effet des glucocorticoïdes endogènes, les lymphocytes sont séquestrés dans les tissus lymphoïdes et une lymphopénie apparaît. L'association d'une neutropénie et d'une lymphopénie conduit à une leucopénie.

Très rapidement, sous l'action des facteurs humoraux tels que le Neutrophil-Releasing factor (NRF), les neutrophiles du pool de réserve sont libérés par la moelle osseuse tandis que la granulopoïèse est accélérée par le G-CSF (Granulocytes Colony Stimulating Factor). Cependant le pool de réserve en neutrophiles étant limité chez les bovins, la neutropénie persiste généralement, en raison de la consommation très rapide des cellules matures dans les tissus inflammatoires. On assiste alors à l'apparition de formes immatures (neutrophiles non-segmentés, voire métamyélocytes, myélocytes ou promyélocytes) dans la circulation sanguine. Ce phénomène est nommé "déviation à gauche" ou "glissement à gauche" de la courbe d'Arneth ("left shift" en anglais) et qualifié de régénératif quand le nombre de cellules immatures n'excède pas celui des neutrophiles segmentés et de non-régénératif dans le cas contraire.

La neutropénie persiste généralement entre 24 et 48 heures [37, 127] voire plus longtemps dans certains cas où le pronostic est mauvais (cf. infra) [221, 256].

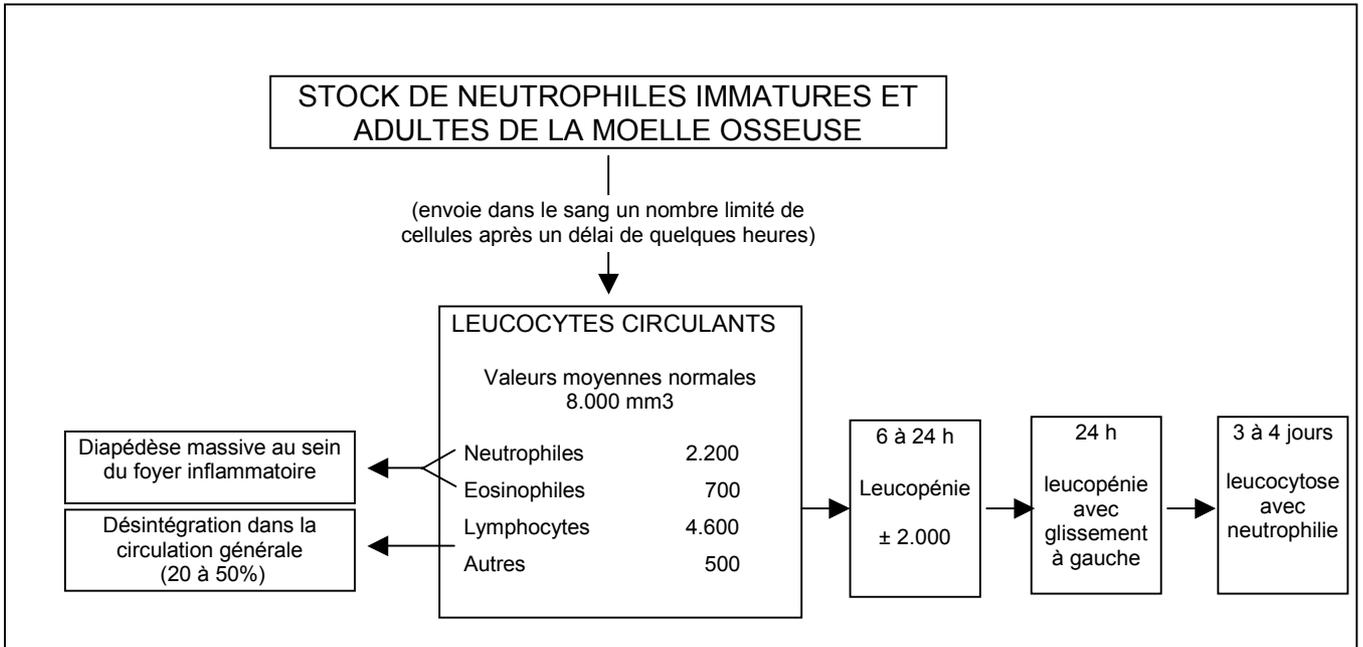


Figure 9 : dynamique de la réponse leucocytaire aux infections bactériennes aiguës chez les bovins, d'après [221].

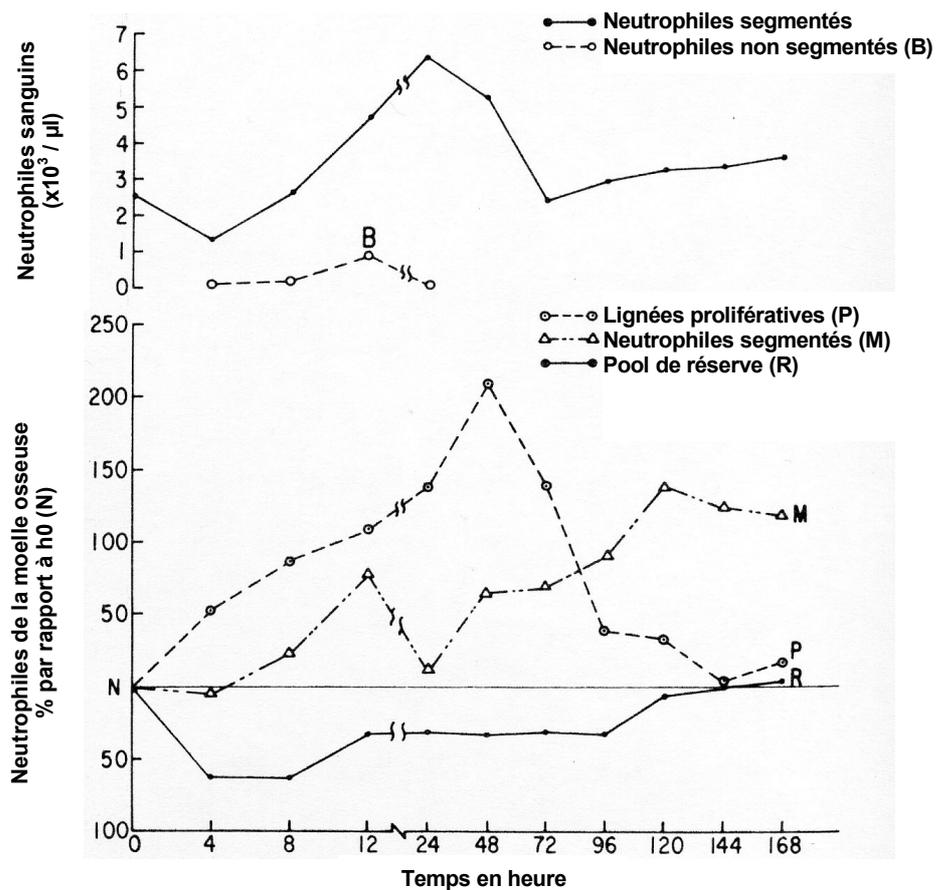


Figure 10 : cinétique de variation précoce des différentes populations leucocytaires sanguines lors d'inoculation intramaire expérimentale d'endotoxine d'E.coli, d'après [127].

La figure 10 illustre ce qui vient d'être décrit. Le leucogramme et le myélogramme obtenus sur une vache suite à l'injection intramaire d'endotoxine d'*Escherichia coli* est caractérisé par une neutropénie, une diminution du nombre de granulocytes de réserve ("pool de réserve" = R), une augmentation des cellules prolifératives et matures dans la moelle (P et M) ainsi qu'une libération des cellules immatures (B) [127].

b) Evolution lors de réaction inflammatoire aiguë avec résolution.

La seconde phase de la réaction inflammatoire, après 24 à 48 heures, est caractérisée par une neutrophilie rebond avec ou sans persistance de cellules immatures [38, 256, 268, 279]. Elle résulte (i) de la stimulation de la granulopoïèse qui compense la consommation des neutrophiles dès la 8<sup>e</sup> ou 12<sup>e</sup> heure, et (ii) de la démargination des neutrophiles de certaines zones capillaires où ils sont séquestrés (poumons, rate) vers la circulation sanguine [51, 127]. Comme la moelle met entre quatre et six jours pour rétablir le pool de réserve, la déviation à gauche des neutrophiles persiste [221].

Chez le veau de moins de deux mois, la neutrophilie est souvent plus marquée que chez l'adulte en raison d'un pool de réserve plus important et les cellules immatures sont plus rarement observées lors d'inflammation modérée [37].

La neutrophilie persiste entre quelques jours et une semaine avant que le leucogramme ne retourne à des valeurs normales [37, 127]. Elle s'accompagne d'une granulopoïèse intense qui conduit au rétablissement des différents pool de la moelle osseuse.

c) Cinétique lors de réaction inflammatoire chronique

De nombreuses atteintes chroniques sont associées à un nombre de leucocytes compris dans les valeurs usuelles [37]. Le comptage cellulaire différentiel permet parfois de mettre en évidence une neutrophilie (neutrophiles segmentés), et/ou une lymphocytose et/ou une monocytose. Une stimulation antigénique persistante, en particulier lors de phénomènes suppurés localisés (abcès, métrite), est à l'origine d'une leucocytose marquée (entre 15 000 et 60 000 cellules/mm<sup>3</sup>) dont la principale composante est une neutrophilie massive [272, 279].

Dans le cas de traumatismes délabrants ou d'hématome, la résorption de débris cellulaires importants conduit à une monocytose et une éosinophilie modérées (5 à 10 %) [17, 279].

Sur 50 animaux atteints d'affections chroniques diverses, une leucocytose était détectée

sur 36 %, une neutrophilie sur 70 % [119]. La présence de neutrophiles non segmentés était observée dans 28 % (14/50) des cas.

La réactivation d'un foyer inflammatoire chronique conduit à une formule sanguine associant une leucocytose minime à modérée, une neutrophilie et parfois une monocytose.

### III.1.2 - Cinétique des marqueurs protéiques

#### a) Phase précoce

Diverses études ont permis de caractériser l'évolution précoce des concentrations sériques de certaines protéines de la phase aiguë. Il semble que la SAA soit la PPA dont l'apparition est la plus précoce chez les bovins. Ainsi lors d'une infection expérimentale par *M. Haemolytica* A1 ( $4.10^{10}$  UFC/animal) par voie intra-trachéale, une augmentation significative de la SAA est notable dès les 3 premières heures, pour atteindre 18 mg/l, 10 heures après l'inoculation. Cette progression est linéaire. En revanche les concentrations sériques d'haptoglobine demeurent peu modifiées durant la même période (figure 11) [118].

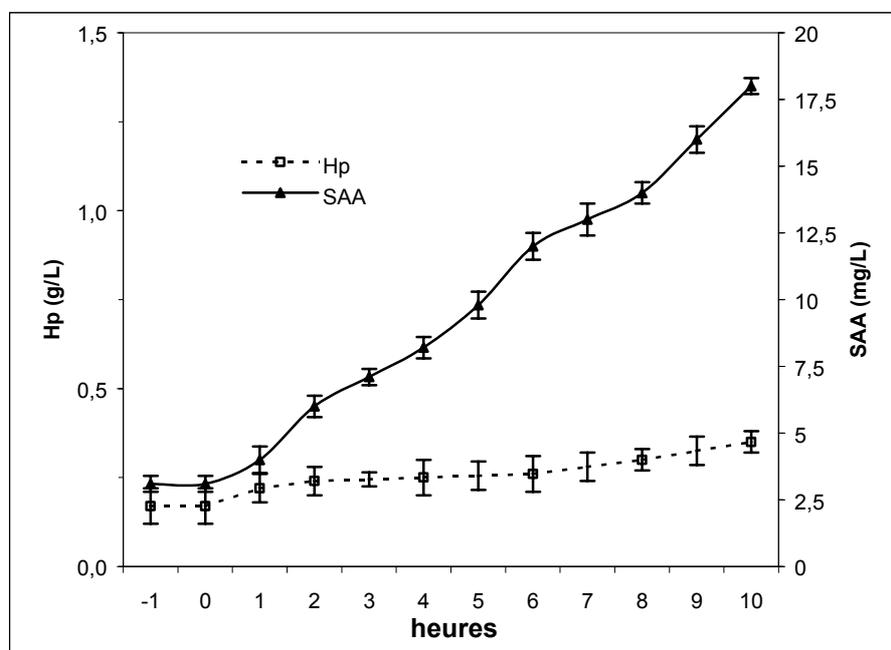


Figure 11 : Cinétique précoce de l'haptoglobine (□) et de la SAA (▲) chez 4 génisses suite à l'administration intra-trachéale de  $1,2.10^{11}$  CFU de *M. hemolytica* A1, d'après [118].

Lors d'une inflammation aiguë provoquée par l'injection intraveineuse d'endotoxine 0111 d'*Escherichia coli* B4 (0.15 µg/kg) l'augmentation de la SAA est significative dès la 5<sup>e</sup> heure post-injection [24].

Des résultats similaires ont été obtenus en injectant cette même endotoxine (LPS 0111:B4, 0.2µg/kg, IV) sur des périodes de 100 minutes : l'élévation de la concentration sérique en SAA était significative dès la première heure, tandis que la concentration en haptoglobine restait inchangée pendant les 6 premières heures de mesure [274]

Les concentrations sériques en haptoglobine,  $\alpha_1$ -AGP,  $\alpha_1$ -PI et fibrinogène varient peu dans les premières 24 heures suivant le début du phénomène inflammatoire [41, 42, 110, 112].

Une diminution significative du fibrinogène est cependant observée entre 2 et 17 heures suite à l'injection d'endotoxine d'*E.coli* [51]. Ce phénomène traduit une consommation importante du fibrinogène liée à une coagulation intravasculaire disséminée. La stimulation plus tardive de la synthèse hépatique du fibrinogène par les LPS est responsable de l'augmentation secondaire de sa concentration plasmatique.

#### b) Cinétique lors d'inflammation aiguë

- Protéines positives

De nombreuses études concernent l'évolution des concentrations des PPA lors d'inflammation aiguë provoquée par divers stimuli : essence de térébenthine, pneumonies naturelles ou expérimentales, d'origine bactérienne à *M. haemolytica*, ou virales (VRS, BHV-1), métrites, mammites expérimentales ou naturelles à *E. coli*, péritonites, abcès hépatiques... Il serait inutile de les décrire toutes ici.

Nous prendrons comme référence l'étude publiée par Conner *et al.* en 1988 [41], parce qu'elle prend en compte 5 des principales protéines de la phase aiguë selon un modèle bien établi et parce qu'elle est largement citée dans la littérature. Les concentrations sériques de l'haptoglobine, de la séromucoïde (=  $\alpha_1$ -AGP), de l'antitrypsine (=  $\alpha_1$ -PI), de la céruloplasmine et du fibrinogène sont suivies pendant 17 jours suite à l'injection sous-cutanée d'essence de térébenthine (figure 12).

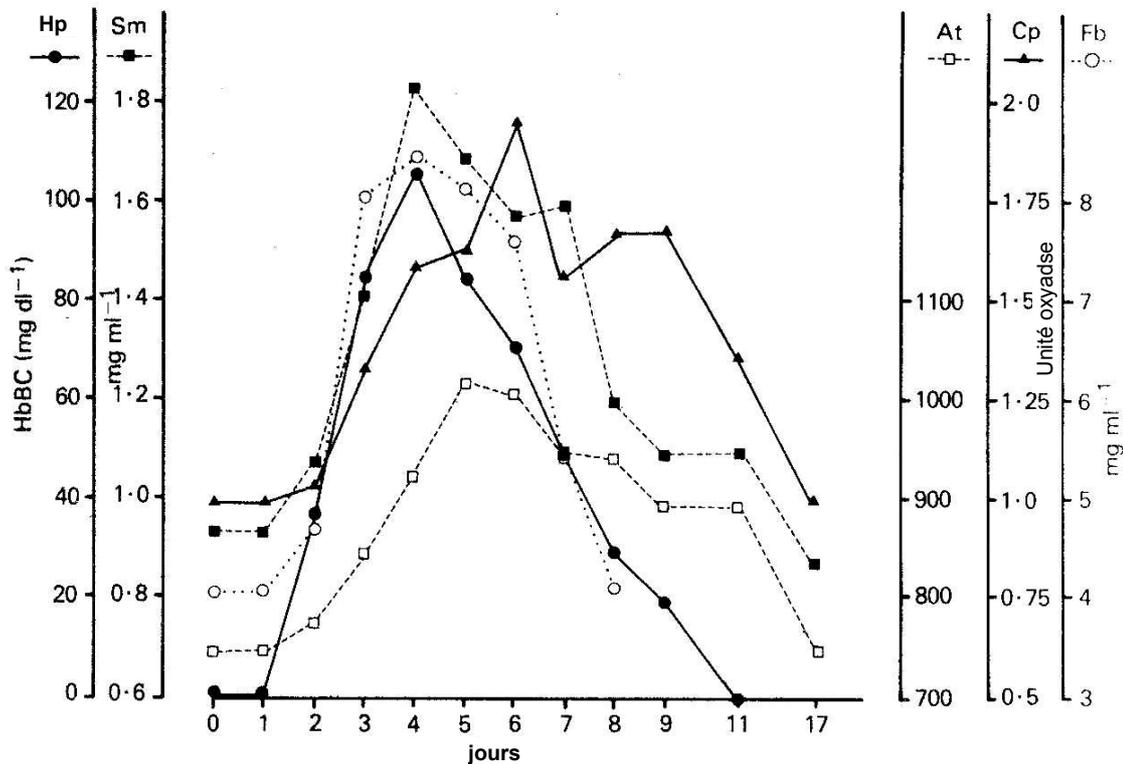


Figure 12 : concentrations sériques d'haptoglobine (Hp), alpha-1 AGP (Sm), alpha-1PI (PI), céruloplasmine (Cp) et fibrinogène (Fb), chez quatre veaux, suite à l'injection sous-cutanée d'essence de térébenthine (j0), d'après [41].

Pour l'ensemble des paramètres suivies, aucune variation significative n'est observée avant 18 à 24 heures. Les concentrations sériques sont maximales entre 4 à 6 jours après l'injection et les concentrations retournent aux valeurs pré-injection entre 8 et 17 jours.

Le tableau 15 résume les principales caractéristiques cinétiques des PPA pour lesquelles des données sont disponibles : première augmentation significative par rapport aux valeurs usuelles, pic plasmatique, et retour à la normale. Ces évolutions concernent des inflammations aiguës dont l'évolution est favorable soit en raison d'un traitement spécifique, soit par résolution spontanée.

Tableau 15 : caractéristiques cinétiques des principales PPA chez les bovins

| PPA | Augmentation significative | Pic     | Retour aux valeurs usuelles | Type d'inflammation | Références   |
|-----|----------------------------|---------|-----------------------------|---------------------|--------------|
| SAA | 5 j                        | 5-8 j   | ND                          | VRS                 | <b>[102]</b> |
|     | 5 h                        | 17-20 h | ND                          | LPS E. coli         | <b>[24]</b>  |
|     | < 1 h                      | 2-4 j   | 6-8 j                       | Mammite E.coli      | <b>[109]</b> |
|     | 6 h                        | 2 j     | 6 j                         | M. haemolytica      | <b>[117]</b> |

| PPA | Augmentation significative | Pic (jours) | Retour aux valeurs usuelles (jours) | Type d'inflammation | Références   |
|-----|----------------------------|-------------|-------------------------------------|---------------------|--------------|
| Hp  | -                          | 3j          | 9                                   | Mammite E. coli     | <b>[188]</b> |
|     | 15 h                       | 4           | 11                                  | térébenthine        | <b>[41]</b>  |
|     | 24 h                       | 2-3         | 12                                  | Mammite E.coli      | <b>[217]</b> |
|     | 24 h                       | 5-6         | 9                                   | LPS                 | <b>[42]</b>  |
|     | 24 h                       | 3           | ND                                  | M. haemolytica      | <b>[42]</b>  |
|     | 24 h                       | 2           | 8                                   | Mammite E. coli     | <b>[109]</b> |
|     | 1-2j                       | 2-5         | ND                                  | Fièvre aphteuse     | <b>[114]</b> |
|     | 36 h                       | 6-7         | ND                                  | VRS                 | <b>[102]</b> |
|     | 24 h                       | 3           | 14                                  | Mammite E.coli      | <b>[112]</b> |

| PPA             | Augmentation significative (jours) | Pic (jours) | Retour aux valeurs usuelles (jours) | Type d'inflammation       | Références   |
|-----------------|------------------------------------|-------------|-------------------------------------|---------------------------|--------------|
| $\alpha_1$ -AGP | 4                                  | 6-8         | 50-60                               | Abcès hépatiques          | <b>[176]</b> |
|                 | 1                                  | 3           | ND                                  | M. haemolytica            | <b>[42]</b>  |
|                 | ND                                 | 4           | ND                                  | LPS                       | <b>[42]</b>  |
|                 | 2                                  | 4           | 17                                  | Térébenthine              | <b>[41]</b>  |
|                 | 3                                  | 5           | ND                                  | Mammites expé E.coli      | <b>[112]</b> |
|                 | 2                                  | 3-7         | 15-40                               | Laparotomie + ruminotomie | <b>[122]</b> |

| PPA | Augmentation significative (jours) | Pic (jours) | Retour aux valeurs usuelles (jours) | Type d'inflammation | Références   |
|-----|------------------------------------|-------------|-------------------------------------|---------------------|--------------|
| Cp  | 3                                  | 6-7         | 17                                  | Térébenthine        | <b>[41]</b>  |
|     | 5                                  | 5           | ND                                  | LPS                 | <b>[42]</b>  |
|     | 3                                  | 4           | ND                                  | Salmonella Dublin   | <b>[197]</b> |

| PPA            | Augmentation significative (jours) | Pic (jours) | Retour aux valeurs usuelles (jours) | Type d'inflammation            | Références |
|----------------|------------------------------------|-------------|-------------------------------------|--------------------------------|------------|
|                | 2                                  | 3-4         | >9                                  | LPS                            | [42]       |
| $\alpha_1$ -PI | 2                                  | 3-5         | 14                                  | Mammite expé.<br><i>E.coli</i> | [112]      |
|                | 2-3                                | 5-6         | 8                                   | térébenthine                   | [40]       |

| PPA                        | Augmentation significative (jours) | Pic (jours) | Retour aux valeurs usuelles (jours) | Type d'inflammation            | Références |
|----------------------------|------------------------------------|-------------|-------------------------------------|--------------------------------|------------|
| Fibri-nogène               | ND                                 | 8           | 20-40                               | variables                      | [70]       |
|                            | 2                                  | 3           | 14                                  | Mammite expé.<br><i>E.coli</i> | [112]      |
| $\alpha_2$ -macroglobuline | 2                                  | 4           | 9                                   | <i>M. haemolytica</i>          | [42]       |
| ACT                        | 2                                  | 5           | 9                                   | <i>M. haemolytica</i>          | [42]       |
|                            | 2                                  | 4           | 8                                   | Térébenthine                   | [41]       |

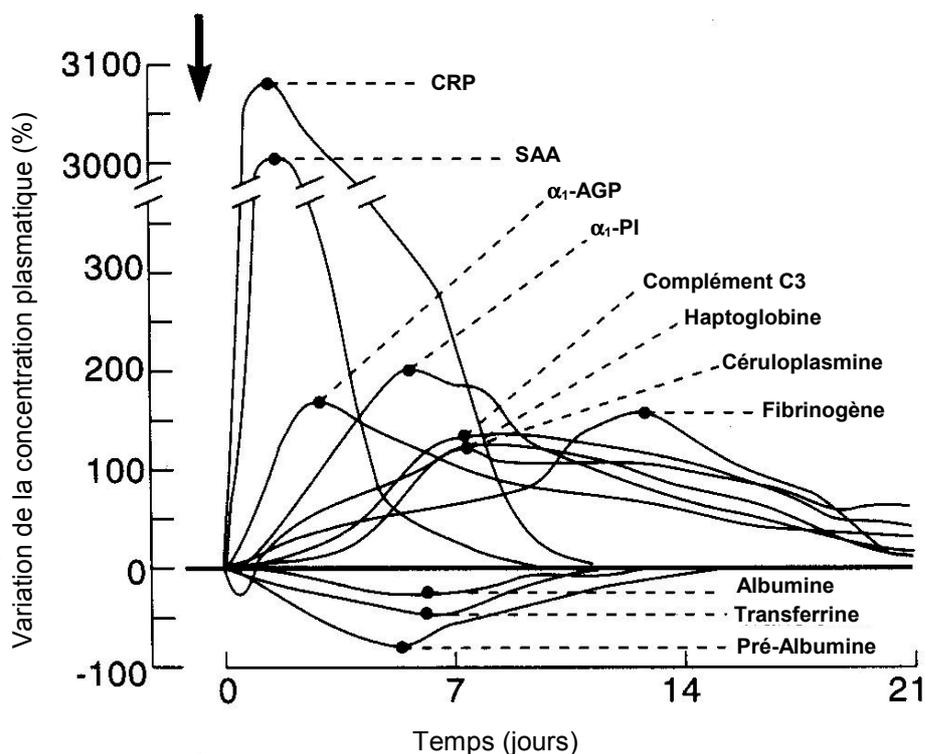


Figure 13 : cinétique des principales protéines de la phase aiguë, explorées chez l'homme suite à une inflammation aiguë avec résolution, d'après[21].

Chaque PPA suit une cinétique qui lui est propre. Les données disponibles chez les bovins, même si elles sont peu nombreuses, semblent en accord avec ce qui est observé chez l'homme.

Chez l'homme, [74, 155, 259, 283] les PPA sont classées en deux groupes selon leurs caractéristiques cinétiques. Les protéines de la phase aiguë à cinétique d'évolution rapide, ou PPA de première classe, comprennent la CRP, la SAA, et, selon certains auteurs, l' $\alpha_1$ -ACT. Leur concentration plasmatique augmente significativement dans les 4 premières heures, le pic est atteint dans les 24-72 heures et leur demi-vie ( $t_{1/2}$ ) d'élimination de 6 à 18 heures. Pour les protéines du second groupe ( $\alpha_1$ -AGP,  $\alpha_1$ PI, haptoglobine, céruloplasmine et fibrinogène) l'augmentation n'est mesurable qu'après 24-48 heures, et atteint un maximum dans les 4 à 10 jours. Leur demi-vie plasmatique d'élimination varie de 24 heures à 5 jours (figure 13).

Il semble que la SAA ait la cinétique la plus rapide chez les bovins (retour aux valeurs normales dans les 6-8 jours). L' $\alpha_1$ -AGP serait le marqueur dont la décroissance serait la plus tardive, pouvant persister à des concentrations élevées plusieurs semaines après la fin de la réaction inflammatoire [110, 122, 176, 237]. Les autres molécules (haptoglobine,  $\alpha_1$ -PI,  $\alpha_1$ ACT, céruloplasmine), de façon similaire et ce qui est connu chez l'homme, auraient une cinétique intermédiaire.

Les gammaglobulines restent inchangées dans la phase aiguë de la réaction inflammatoire au moins jusqu'au 7<sup>e</sup> jour. L'augmentation des protéines totales, parfois observée durant cette période, est liée à l'augmentation des  $\alpha$ - et  $\beta$ -globulines comme décrit dans les profils électrophorétiques de vaches souffrant de réticulo-péritonite aiguë (moins de sept jours) [70]. Cependant Johnston et Morris (1996) [132] soulignent que, le plus souvent, l'augmentation des PPA ne se traduit pas par une hyperprotéinémie.

- Protéines négatives

La concentration en protéines totales (PT) diminue sensiblement dans les premiers jours de la réaction inflammatoire, principalement en raison de l'exsudation plasmatique et de la diminution de la synthèse hépatique d'albumine. L'exsudation entraîne une diminution d'environ 20 % de la concentration en albumine qui débute dès le premier jour, est maximale au deuxième et se poursuit jusqu'au septième de la réaction inflammatoire aiguë [41, 166]. Conner *et al.* [41] notent une augmentation des protéines totales de 5 % par rapport à leur

concentration initiale entre le 4<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> jour, qui pourrait être liée à la synthèse accrue des protéines positives de la phase aiguë ou au début de la synthèse des gammaglobulines.

### c) Inflammation chronique

Chez l'homme, certains processus inflammatoires chroniques d'origine infectieuse, tumorale, ou immunitaire (arthrite rhumatoïde) sont associés à des concentrations en SAA faiblement pathologiques c'est à dire supérieures aux valeurs usuelles mais inférieures aux valeurs élevées observées lors de réaction inflammatoire aiguë [20, 33, 259]. La synthèse persistante de SAA et sa dégradation partielle conduit à la formation de substance amyloïde A, à l'origine de l'amyloïdose réactive [100 Urieli-Shoval, 2000 #328, 265].

Chez le lapin, l'injection quotidienne de nitrate d'argent pendant 35 jours conduit à des concentrations plasmatiques en SAA supérieures aux valeurs usuelles, mais plus faibles que lors de réaction inflammatoire aiguë [207]. Des observations semblables sont rapportées chez le hamster (Gruys, communication personnelle).

En ce qui concerne les bovins, les études sur la cinétique des concentrations sanguines des différentes protéines de la phase aiguë, lors d'inflammation chronique (évolution supérieure à 10-15 jours), font cruellement défaut. Les données disponibles dans la littérature ne concernent que quelques-uns de ces marqueurs ( $\alpha_1$ -AGP) [122, 176]. Aucune étude expérimentale n'a été menée à partir de modèles d'inflammation chronique dont la date de début et la durée d'évolution étaient connues. Cependant des mesures ponctuelles ont été réalisées chez des animaux atteints de lésions anciennes actives ou non.

Les concentrations sériques de l' $\alpha_1$ -AGP restent élevées en présence d'un phénomène inflammatoire persistant, même si elles subissent des fluctuations (figure 14). Ainsi lors de pneumonie (suppurée ou non), des concentrations en  $\alpha_1$ -AGP voisines ou supérieures à 1g/l ont été détectées jusqu'à 80 jours après le début des symptômes.

Des résultats similaires ont été rapportés sur des bovins atteints d'abcès hépatiques à *Fusobacterium necrophorum* avec des concentrations d' $\alpha_1$ -AGP supérieures aux valeurs usuelles 40 à 50 jours après inoculation [176].

De même, les concentrations plasmatiques en SAA et haptoglobine restent significativement augmentées lors de mammite chronique à *Staphylococcus aureus*, 21 jours

post-infection [91].

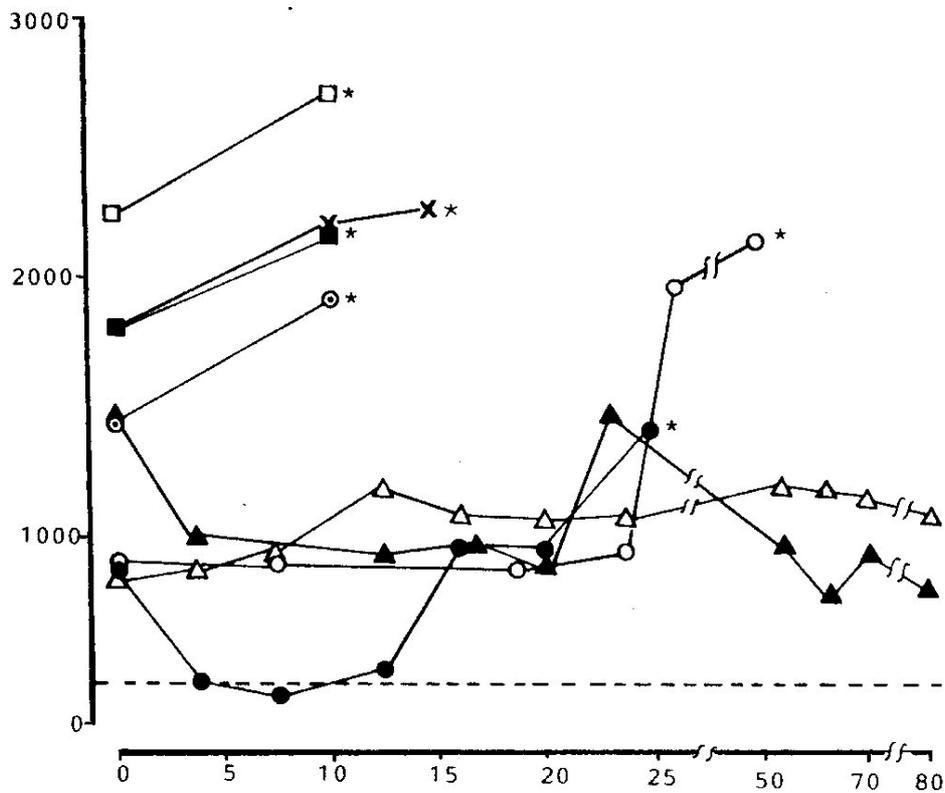


Figure 14 : évolution des concentrations en AGP chez 8 bovins, d'après [122].

■, □ et x mammites aiguë post partum ; ▲ et △ bronchopneumonie chronique ; ●, ○ et ⊙ réticulo-péritonite traumatique chronique ; \* euthanasie

La SAA, l'haptoglobine et l' $\alpha_1$ -AGP étaient élevées chez respectivement 54 %, 24 % et 72 % des 50 animaux atteints de diverses affections chroniques (pneumonies, péricardites, entérites, néphrites, abcès hépatiques, médiastinaux, spléniques ou à localisations multiples, amyloïdose...) [119]. Toutefois, les concentrations mesurées étaient plus faibles que lors d'atteintes aiguës. En revanche, Alsemgeest *et al.* (1994) [4] mettent en évidence des concentrations en haptoglobine supérieures lors d'atteintes chroniques par rapport aux atteintes aiguës et n'observent pas de différence pour la SAA.

Chez l'homme, le fibrinogène est un marqueur d'inflammation chronique active en raison de sa cinétique lente ( $t_{1/2} = 5$  jours) [259]. Chez les bovins, quand il est dosé en parallèle des

protéines totales (globulines), il est considéré comme un marqueur de l'inflammation aiguë, Chez l'homme, le fibrinogène est un marqueur d'inflammation chronique active en raison de sa cinétique lente ( $t_{1/2} = 5$  jours) [259]. Chez les bovins, quand il est dosé en parallèle des protéines sériques totales, il est considéré comme un marqueur d'inflammation aiguë. Cependant les concentrations en fibrinogène demeurent généralement élevées en cas de phénomène inflammatoire chronique actif, ou lors de réactivation d'un foyer inflammatoire ancien [38]. Ainsi des concentrations anormalement élevées ( $> 8\text{g/l}$ , jusqu'à  $18\text{g/l}$ ) ont été mesurées jusqu'à plus de soixante jours par rapport à l'examen initial lors d'endocardite thrombosante associée à des abcès multiples, lors de réticulo-péritonite traumatique d'extension sévère, de péritonite post-opératoire... [70, 254]. Des valeurs supérieures à  $12\text{g/l}$  peuvent aussi être observées pendant plusieurs semaines lors de pyélonéphrite (observations personnelles).

L'augmentation des protéines totales est constante lors d'inflammation chronique à composante infectieuse ou immunitaire. Au-delà de 8 à 10 j d'évolution, dans la quasi-totalité de 187 cas d'infection clinique (réticulite par corps étranger, mammite d'été, mammite chronique subclinique, polyarthrite et fourbure chronique, infection urinaire (pyélonéphrite), abcès divers, pneumonie subaiguë chronique), les concentrations des protéines totales, des  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et surtout des gammaglobulines sont augmentées [151]. Les fortes concentrations en  $\alpha$ - et  $\beta$ -globulines correspondent à l'accroissement de certaines PPA.

Une diminution de la synthèse d'albumine est fréquemment associée à cette augmentation des protéines totales [132, 151].

### **III.1.3 - Cinétique des marqueurs du lait**

#### a) Mammite aiguë

Le CCS et les concentrations en albumine et en  $\alpha_1$ -Antitrypsine du lait ont été suivis lors de mammites naturelles et expérimentales (injection intra-mammaire d'endotoxine d'*E. coli*). Pour chacun des marqueurs étudiés, les valeurs atteignent leur maximum de 2 à 12 heures post-injection [109, 115, 202]. La normalisation se fait en 15 jours pour le CCS et en 20 jours pour l'albumine et l' $\alpha_1$ -Antitrypsine. Les temps de demi-vie plasmatiques sont les suivants : CCS :  $1.41 \pm 0.49$  jour ; albumine :  $2.49 \pm 1.55$  jours et  $\alpha_1$ -Antitrypsine :  $2.55 \pm 1.81$  jours.

## b) Mammites chroniques

A partir de mammites naturelles évoluant vers la chronicité, et en l'absence de guérison bactériologique, les valeurs du CCS et les concentrations du lait en albumine et en  $\alpha_1$ Antitrypsine demeuraient élevées 30 jours post-infection. [115, 202].

### **III.2 - LIAISON DES MARQUEURS AVEC LA SEVERITE ET LA GRAVITE DE L'INFLAMMATION**

La sévérité et la gravité de l'atteinte est importante à apprécier, entr'autres pour proposer un pronostic. L'examen clinique est relativement subjectif et reste peu précis. L'examen nécropsique, basé sur l'intensité et l'extension des lésions, fournit des éléments plus objectifs. Cependant la corrélation entre les deux approches n'est pas toujours bonne : l'atteinte fonctionnelle ne reflète pas nécessairement l'atteinte lésionnelle.

#### **III.2.1 - Paramètres hématologiques**

La leucopénie, chez les bovins, de même qu'une déviation à gauche des neutrophiles (nombre de neutrophiles immatures supérieurs au nombre de neutrophiles matures) peuvent être utilisées comme critère de gravité de l'inflammation. Toutefois, la valeur pronostique de ces deux critères semble faible.

Le caractère non régénératif du déplacement à gauche peut être mis en relation avec la gravité de l'atteinte. Lors d'administration d'endotoxine d' *E.coli* (0.1 à 0.2 mg/kg par voie intraveineuse) ou de septicémie (*E. coli* ou *Salmonella* spp.) les veaux les plus affectés étaient ceux pour lesquels le caractère non-régénératif était le plus marqué [256]. Des résultats semblables ont été obtenus pour des vaches ayant survécu ou succombé à des mammites aiguës, gangreneuses ou non [258]. En revanche dans une autre étude, sur 54 vaches atteintes de mammite aiguë à *E. coli*, une leucopénie avec déviation à gauche marquée était observée chez 37 % d'entre elles, mais une seule est morte [258].

La persistance d'un déplacement à gauche des polynucléaires neutrophiles permet d'apprécier la gravité. Au delà de 4 à 5 jours, surtout s'il est associé à une leucopénie, il est d'un mauvais pronostic. Il signifie l'inadéquation et/ou l'épuisement de la réponse de la moelle

osseuse [279]. Ce phénomène est le plus fréquemment observé d'endotoxémie ou lors de septicémie [1, 38, 51, 272, 279].

Dans les cas les plus sévères, peuvent être observés des neutrophiles dits "toxiques", c'est à dire dont le cytoplasme apparaît bleuté et spumeux en coloration de May-Grunvald-Giemsa ou de Wright. Associée à un déplacement à gauche non-régénératif (nombre de neutrophiles non segmentés supérieurs à celui des neutrophiles segmentés), la mise en évidence de telles anomalies est d'un mauvais pronostic.

La numération formule sanguine apporte des renseignements indéniables sur la gravité de l'inflammation. Cependant les données restent qualitatives. La définition de critères objectifs (ampleur, caractère et persistance du déplacement à gauche, ampleur et persistance de la leucopénie, présence et proportion de neutrophiles toxiques) pour évaluer la sévérité du phénomène inflammatoire reste difficile.

### **III.2.2 - Marqueurs protéiques**

Malgré quelques données contradictoires, il semble désormais admis qu'il existe une forte corrélation positive entre les concentrations de la plupart des PPA et la sévérité ou la gravité du phénomène inflammatoire.

Cette relation a été mise en évidence par l'injection sous-cutanée de quantité croissante d'essence de térébenthine à l'origine de concentrations proportionnelles en haptoglobine et en  $\alpha_1$ -AGP [41]. Cet effet dose n'a pas été observé pour la céruloplasmine et l' $\alpha_1$ -antitrypsine.

#### **a) Corrélation avec les signes cliniques**

Lors de mammite aiguë expérimentale induite par *Actinomyces pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum* et *Peptostreptococcus indolicus*, les concentrations en haptoglobine,  $\alpha_1$ -AGP et  $\alpha_1$ -antitrypsine étaient significativement plus élevées les animaux qui qui présentaient des signes généraux (abattement, anorexie, hyperthermie, atonie ruminale, tachycardie) et locaux (œdème, induration, chaleur et douleur) plus marquées et plus persistants par rapport aux vaches qui guérissaient plus rapidement (figure 15, bcd) [112]. Cependant ces différences ne sont observées qu'aux pics de concentration sérique de ces marqueurs, soit entre 2 et 5 jours post inoculation. Cette étude ne met pas en évidence de

différence significative entre les deux lots pour le fibrinogène (figure 15, a).

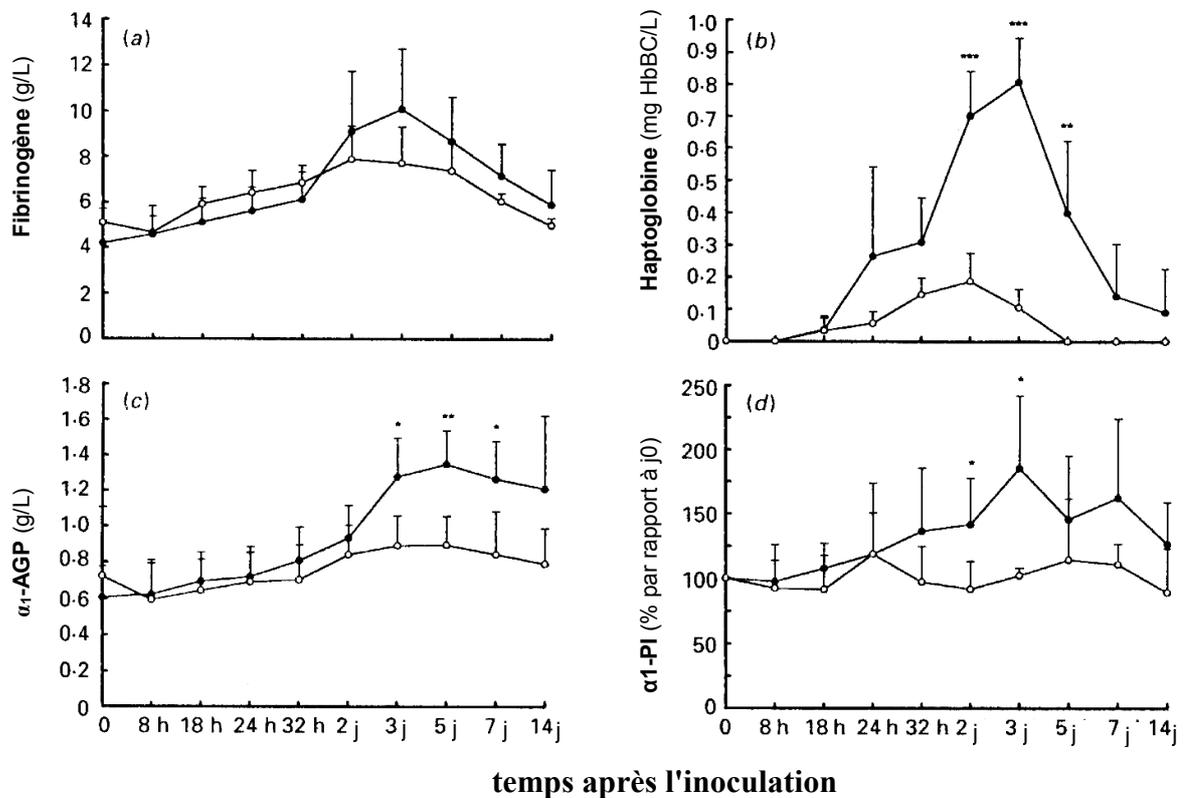


Figure 15 : cinétique de variation des concentrations plasmatiques en fibrinogène (a), haptoglobine (b),  $\alpha_1$ -AGP (c) et  $\alpha_1$ -PI (d) pour le groupe cliniquement sévèrement atteint (points noirs pleins; n=4) et cliniquement moins atteints (point blancs, n=6) suite à l'inoculation intramammaire d'*A.pyogenes*, *F. necrophorum* et *P. indolicus*. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, d'après [112].

Dans un autre modèle de mammite expérimentale à *Escherichia coli*, les concentrations de la SAA, mais pas celle de l'haptoglobine, étaient en relation avec le score d'atteinte clinique (même critères cliniques locaux et généraux que précédemment) et l'issue de la maladie (mort ou survie) [109].

Des observations semblables ont été obtenues lors d'infection expérimentale à *M. haemolytica* associée au BHV-1. Les concentrations sériques d'haptoglobine sont corrélées avec le score clinique d'atteinte ( $r^2 = 0.481$ ), la température rectale maximale ( $r^2 = 0.345$ ), et la variation pondérale ( $r^2 = -0.391$ ). Une différence significative est observée pour l'haptoglobine entre les animaux qui survivent à l'épreuve et ceux qui succombent [89].

Une liaison positive entre la température rectale, le score clinique et les concentrations en haptoglobine à 3 jours post-inoculation a été mise en évidence chez des veaux inoculés per os

par un mélange de *Salmonella* Dublin, *S. Enteritidis* et *S. Heidelberg* [49].

Des résultats contradictoires sont cependant rapportés par quelques études de terrain :

Sur 60 jeunes bovins à l'engraissement atteints de pneumonie, aucune liaison n'a été détectée entre la concentration en haptoglobine et la température rectale, ou entre cette concentration et le devenir (survie ou mort) des animaux [282].

Lors de mammites naturelles, ni la SAA, ni l'haptoglobine, ni l' $\alpha_1$ -AGP sériques n'ont permis de différencier des vaches faiblement (n=25) ou modérément (n=20) atteintes sur le plan clinique. Ces trois paramètres étaient cependant significativement plus élevés chez les animaux malades concentrations comparés à des témoins sains [67].

En revanche, lors de mammites colibacillaires spontanée, les concentrations en haptoglobine et en  $\alpha_1$ -AGP étaient liées au score clinique (atteintes sévères caractérisées par des signes systémiques et locaux sévères et persistants ; atteintes légères caractérisées par des signes généraux moins importants et un retour à un état général et un aspect du lait normaux dans les 3 jours)[188].

#### b) Corrélation avec les lésions

Les concentrations maximales de SAA et d'haptoglobine semblent refléter la sévérité et l'étendue des lésions sur des animaux atteints d'abcès hépatiques [176].

De même, lors d'affections variées, la sévérité et l'étendue des lésions mises en évidence à l'abattoir est fortement corrélée aux valeurs de la SAA ( $r^2=0.85$ ) et de l'haptoglobine ( $r^2=0.94$ ) [93].

Lors d'infection expérimentale par le Virus Respiratoire Syncycial Bovin, les concentration en SAA et en haptoglobine étaient fortement liées à l'étendue et la sévérité des lésions observées à l'autopsie [102]. La meilleure corrélation était obtenue pour l'haptoglobine (Heegaard, communication personnelle)

Cependant, divers auteurs font état d'observations contraires lors de pasteurellose aiguë naturelle [282, 290] ou expérimentale [166]. Cette dernière équipe montre toutefois que les courbes d'évolution des concentrations sériques d'haptoglobine diffèrent selon l'intensité et/ou l'étendue des lésions observées à l'autopsie, avec une diminution beaucoup plus tardive

chez animaux montrant les lésions pulmonaires les plus sévères [166]. Des observations semblables concernant l' $\alpha_1$ -AGP ont été rapportées dans un autre modèle expérimental (injection d'essence de térébenthine) [41].

### **III.2.3 - Paramètres du LCR**

Les études cherchant à mettre en évidence une liaison entre l'ampleur des modifications des marqueurs de l'inflammation dans le LCR et l'issue de la maladie (mort ou survie avec ou sans séquelles) sont peu nombreuses dans la littérature. Elles concernent principalement la listériose [229] et les méningo-encéphalites bactériennes chez le veau [234]. Chez l'homme, une augmentation importante de l'activité de l'ASAT (aspartate amino transférase) et de la CK (créatine kinase) est d'un mauvais pronostic [50], Ces marqueurs n'ont pas été explorés chez les bovins.

Lors de listériose ovine, la concentration en protéines totales du LCR et le nombre de leucocytes des animaux ayant répondu favorablement au traitement (n=4) étaient significativement plus faibles que chez ceux n'ayant pas survécu (n=6) [226]. Cependant le nombre de d'animaux inclus était faible Dans une autre étude portant sur 21 animaux, cette différence existait seulement pour les PT mais n'était pas significative [229].

Chez le veau, lors de méningo-encéphalites bactériennes, aucune corrélation n'a été observée entre le devenir des animaux et le résultat de l'analyse de LCR (concentration en protéines totales et paramètres cytologiques) [234].

Plusieurs explications peuvent être avancées. Les modifications du LCR sont très variables selon la localisation de l'inflammation : lors d'abcès de l'encéphale, par exemple, des valeurs de 2 à 14400 leucocytes / $\mu$ L et de 0.4 à 8.96 g/l pour les protéines totales ont été observées selon que la lésion siègeait près des méninges ou profondément dans le cortex cérébral [262]. La cytologie du LCR ne correspond pas forcément à la nature des lésions : les neutrophiles sont très mobiles et peuvent prédominer dans le LCR, alors que les cellules mononucléées, moins mobiles, seront plus présentes dans le tissu nerveux [262].

### **III.2.4 - Paramètres du lait**

#### c) Protéines de la phase aiguë

Dans une étude récente, les auteurs ont mesuré les concentrations en haptoglobine et en SAA dans le lait de vaches atteintes de mammites clinique d'intensité marquée (signes généraux présents, induration et chaleur de la mamelle, modification de l'aspect macroscopique du lait, n=16) et lors de mammites d'intensité légère (absence de signes généraux et locaux, modification du lait uniquement, n= 13) [69]. Pour l'haptoglobine, il n'existe pas de différence significative entre les deux groupes de vaches malades, même si les concentrations mesurées sont supérieures à celles obtenues pour les vaches saines. En revanche, la discrimination entre les deux groupes a été possible avec la SAA.

Les concentrations du lait en  $\alpha_1$ -Antitrypsin et en albumine seraient liées à l'intensité clinique de la mammites [115, 202].

#### d) Comptage des cellules somatiques

Le CSS n'est généralement pas utilisé dans le diagnostic des mammites cliniques, en raison des difficultés techniques dues aux modifications macroscopiques du lait (grumeaux). Les quelques études expérimentales ayant dénombré les cellules somatiques lors de mammites cliniques n'ont pas mis en évidence de liaison avec l'intensité de l'atteinte [69, 109].

**TROISIÈME PARTIE**  
**APPLICATIONS ET PERSPECTIVES EN MEDECINE BOVINE**

Les marqueurs hématologiques, cytologiques et biochimiques de l'inflammation permettent-ils de mettre en évidence l'existence d'un foyer inflammatoire qui n'est pas forcément identifiable par le simple examen clinique de l'animal, d'en apprécier l'éventuel stade évolutif ainsi que la sévérité ?

Précédemment nous avons abordé les phénomènes physiologiques et pathologiques susceptibles de faire varier ces paramètres en dehors du contexte inflammatoire et les différences de cinétique entre les marqueurs. Il semble alors difficile de donner des valeurs statistiques (sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive, valeur prédictive négative) définitives aux différents marqueurs étant donné que ces valeurs varient elles-mêmes selon l'ampleur et le stade évolutif du phénomène inflammatoire sous-jacent.

Les performances intrinsèques (sensibilité - Se et spécificité - Sp) peuvent être modulées selon le choix des valeurs seuils au-dessus desquelles le résultat est considéré comme étant associé à un foyer inflammatoire. Les valeurs usuelles sont généralement choisies de façon à inclure 95 % des valeurs obtenues dans une population d'animaux «sains», ou dit autrement, l'ensemble des valeurs comprises dans l'intervalle moyenne de la population plus ou moins deux écart-types. Ainsi en réduisant l'intervalle de référence peut-on réduire le nombre de faux négatifs (= animaux malades avec des valeurs de test comprises dans l'intervalle de référence) et donc augmenter la sensibilité, avec pour conséquence une augmentation des faux positifs (= animaux sains avec des valeurs de test en dehors des valeurs usuelles) et donc une diminution de la spécificité [129, 250]. L'impact est d'autant plus marqué que la variation du paramètre est faible (protéines totales, fibrinogène, céruloplasmine ou encore  $\alpha_1$ -AGP) ou que ses variations physiologiques ou individuelles sont élevées (comptage des cellules somatiques du lait, cytologie des différents liquides de ponction...).

Les valeurs statistiques extrinsèques (Valeur Prédictive Positive - VPP et Valeur Prédictive Négative - VPN) sont étroitement liées à la sensibilité et à la spécificité d'un test mais dépendent aussi fortement de la prévalence de la maladie. Ainsi, plus celle-ci est faible, plus la VPP sera faible et la VPN forte, et inversement lors de prévalence élevée. Lors de prévalence très faible (autour de 1%) même un test de très forte sensibilité et spécificité (95 %) n'aura une VPP que de 17 % contre une VPN de 99 %. En revanche pour une prévalence de 50 % la VPP est de 95 % et la VPN de 96 %.

## **IV - MISE EN EVIDENCE D'UN FOYER INFLAMMATOIRE**

### **IV.1 - PARAMETRES SANGUINS**

#### **IV.1.1 - Protéines de la phase aiguë**

Les valeurs rapportées pour l'homme par Clavin *et al.* (1988) [36] à partir d'un de 102 sérums inflammatoires sont les suivantes (tableau 16) :

Tableau 16 : performances statistiques intrinsèques de cinq PPA et de la vitesse de sédimentation pour le dépistage d'un syndrome inflammatoire chez l'homme, d'après [36].

| Marqueur sérique         | Sensibilité (%) | Spécificité (%) |
|--------------------------|-----------------|-----------------|
| CRP                      | 61              | 83              |
| $\alpha_1$ -PI           | 76              | 78              |
| $\alpha_1$ -AGP          | 87              | 66              |
| $\alpha_1$ -ACT          | 95              | 82              |
| Haptoglobine             | 62              | 89              |
| Vitesse de sédimentation | 60              | 84              |

Pour les bovins nous rapporterons les données issues d'études de terrain (tableau 17).

Tableau 17 : sensibilité, spécificité, VPP et VPN (%) des marqueurs sanguins pour la mise en évidence d'un processus inflammatoire chez les bovins.

| Paramètre                        | Seuils   | Nombre d'animaux et prévalence (%) | Se (%)         | Sp (%)         | VPP (%)        | VPN (%)        | modèle                        | références   |
|----------------------------------|--|------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------------------------|--------------|
| Hp                               | 10 mgHbBC%   | N = 279, p = 20%                   | 59             | 89             | 57             | 90             | Divers<br>(A ou C)            | <b>[216]</b> |
| Hp                               | NE <sub>1</sub>  | N = 1034, p= 0.05%                 | 67             | 99             | 86             | 99             | Divers<br>(A ou C)            | <b>[252]</b> |
| Hp                               | 10 mgHbBC%   | N = 78, p= 41%                     | 90             | 100            | 100            | 94             | Divers<br>(A ou C)            | <b>[160]</b> |
| α <sub>1</sub> -AGP              | 0.45 mg/l  | N = 218, p= 25%                    | 84             | 97             | 90             | 94             | Divers<br>(A ou C)            | <b>[255]</b> |
| fibrinogène                      | 8 g/l  | N = 252, p= 55%                    | 62             | 88             | 87             | 66             | Divers<br>(A ou C)            | <b>[167]</b> |
| Hp<br>SAA<br>α <sub>1</sub> -AGP | 50 mg/l<br>9.6 mg/l<br>0.5 mg/l                          | N = 61, p= 50%                     | 82<br>83<br>62 | 94<br>90<br>91 | 93<br>89<br>87 | 83<br>84<br>70 | Mammites<br>aiguës            | <b>[69]</b>  |
| SAA<br>Hp                        | 10 mgHbBC%<br>NE <sub>2</sub>                            | N = 59, p= 47%                     | 96<br>71       | 80<br>100      | 81<br>100      | 96<br>79       | Divers<br>(A ou C)            | <b>[93]</b>  |
| Hp<br>leucocytes<br>Neutrophiles | 0.2 g/l<br>12.10 <sup>9</sup> /l<br>6.10 <sup>9</sup> /l | N = 42, p= 69 %                    | 86<br>52<br>61 | 85<br>75<br>88 | 93<br>87<br>93 | 73<br>33<br>44 | Divers<br>(A ou C)<br>(ovins) | <b>[246]</b> |

A = processus inflammatoire aigu . C = processus inflammatoire chronique.

NE<sub>1</sub> : Non établi : dosage SRID, valeurs en centimètres.

NE<sub>2</sub> : Non établi : dosage ELISA, valeurs en % d'un sérum de référence.

Selon les études, les performances varient pour un même test. A l'heure actuelle aucune étude d'envergure n'a comparé les principaux des paramètres sur un nombre suffisamment élevé d'animaux, souffrant d'atteintes inflammatoires dont la cause ainsi que durée d'évolution sont connues.

La capacité des différents marqueurs sanguins à détecter un processus inflammatoire dépend des caractéristiques de ceux-ci. Son ampleur et sa cause seront des facteurs importants dans l'appréciation de la sensibilité. Sa durée d'évolution est aussi un élément majeur : les protéines de l'inflammation sont sécrétées en grande quantité lors d'inflammation aiguë alors que les concentrations sont plus faibles, voire normales dans le cas d'inflammation chronique. Le fait d'octroyer une valeur de sensibilité à un marqueur devrait donc tenir compte de la nature précoce ou ancienne de l'inflammation, ce que peu d'études prennent en considération.

Les disparités concernant la spécificité proviennent le plus souvent de la composition des groupes témoins. Le plus souvent, le statut de bonne santé est établi sur des bases cliniques et hématologiques sans aucune autopsie de confirmation. Pourtant, parmi ces animaux, certains sont susceptibles d'être atteints de troubles subcliniques, les valeurs obtenues pour les différents marqueurs pouvant alors être élevées. Ainsi, sur 232 vaches atteintes de troubles inflammatoires subcliniques et ayant des concentrations plasmatiques de SAA augmentées, l'examen clinique n'avait permis d'en détecter que 26 % [137]. Dans une autre étude, les valeurs d'haptoglobine étaient supérieures à la valeur seuil chez 15% de 92 vaches et 6% de 157 génisses cliniquement saines [216]. Les auteurs attribuent ces résultats à l'existence d'atteintes inflammatoires subcliniques. En toute rigueur, ces animaux ne devraient pas être considérés comme des faux positifs. La spécificité calculée n'est donc qu'une approximation, inférieure à la réalité.

Malgré ses difficultés quelques commentaires peuvent être faits sur la base des chiffres rapportés.

Les performances de la fibrinogénémie ( sensibilité autour de 60 % et la spécificité moyenne autour de 85%) pourraient être expliquées par le faible facteur d'augmentation lors d'inflammation (concentration plasmatique multipliée par 1,5 à 2) associé à un large intervalle de valeurs usuelles (de 2 à 7 g/l). Ainsi un doublement de la concentration en fibrinogène chez un animal dont la valeur de base est de 3 g/l ne sera pas, à tort, considéré comme pathologique (diminution de la sensibilité). A l'inverse, l'observation de concentrations de 7 à 8 g/l chez

l'animal sain peut, dans certains cas, être à l'origine de faux positifs (diminution de la spécificité). Ainsi une fibrinogénémie comprise entre 7 et 8 g/l a été observée chez 10 % de 716 bovins cliniquement sains et ayant des paramètres hématologiques normaux [254]. L'hémoconcentration serait un des facteurs principaux de l'augmentation non pathologique de la concentration en fibrinogène [70].

Cependant, dans une étude portant sur 22 animaux atteints de péritonite, la concentration plasmatique en fibrinogène s'est révélée sensible et spécifique (respectivement 80 % et 95 %) [280]. Les fortes concentrations plasmatiques observées communément lors d'atteinte des séreuses peuvent expliquer ces résultats [111]. D'autres études font états de valeurs de l'ordre de 45 % pour la sensibilité et de 85 % pour la spécificité quand le groupe témoin est composé d'animaux souffrant de troubles abdominaux n'affectant pas ou peu le péritoine (déplacement ou surcharge de la caillette, indigestion vagale, entérite...)

La SAA bénéficie de la sensibilité la plus élevée, entre 80 et 100 % [69, 93]. Sa spécificité a été évaluée à 80 et 90 %. A l'inverse, l'haptoglobine semble plus spécifique (85 à 100%) que sensible (59 à 90 %) [69, 93, 216, 246]. Chez certains animaux la teneur plasmatique en SAA est augmentée alors que celle de l'Hp reste inchangée.

Les différences entre ces deux marqueurs pourraient être attribuées au fait que la production de SAA est facilement stimulée par les cytokines impliquée dans la synthèse des protéines de la phase aiguë. En effet l'IL-6 seule est capable d'induire la synthèse de la SAA, tandis que celle de l'Hp nécessite la stimulation des hépatocytes par l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  (voir page 52)[6].

La SAA est présente à des concentrations élevées même dans les cas d'inflammation minime à modérée, mais est sensible à d'autres phénomènes non inflammatoires (stress par exemple). Chez l'homme, un rhume banal est responsable d'une augmentation significative des concentrations plasmatiques en SAA [277]. Une teneur plasmatique élevée en Hp signifierait en revanche une inflammation plus importante, avec une spécificité vis à vis de la réaction inflammatoire proche de 100% [119, 216]. L'analyse combinée de ces deux marqueurs semble donc être prometteuse.

Les valeurs de sensibilité rapportées pour l' $\alpha_1$ -AGP sont très variables, entre 62 et 84 % selon les études [69, 255]. Ces différences proviennent de la cinétique particulière de ce marqueur, qui atteint tardivement son pic de concentration plasmatique (autour de 8-10 jours).

Lors de phénomène inflammatoire très récent, il est compréhensible d'observer des valeurs peu modifiées.

#### **IV.1.2 - Numération formule**

Les paramètres hématologiques sont les moins sensibles qu'il s'agissent des leucocytes totaux ou des neutrophiles [246]. Plusieurs explications peuvent être avancées :

1- d'un point de vue cinétique, la leucopénie/neutropénie suivie d'une leucocytose/neutrophilie (voire page 88 et suivantes) explique que la possibilité que le nombre de globules blancs soit dans les valeurs usuelles au moment du prélèvement [59, 222, 256, 258]. Ainsi dans une étude portant sur 54 cas de mammite clinique aiguë, le nombre de globules blancs était en dehors des valeurs usuelles chez seulement 48 % des vaches (leucopénie : 37 % ; leucocytose : 11 %). une neutropénie était observée chez 29,6% et une neutrophilie chez 12,9% des bovins [258].

2- La normalisation précoce du leucogramme, et principalement du nombre de leucocytes totaux, fait de ce paramètre un marqueur peu sensible. Chez 20 bovins atteints d'affections inflammatoires chroniques diverses, le nombre total de leucocytes était modifié chez seulement 35 % d'entre eux (leucocytose ou leucopénie), et une neutrophilie était présente dans seulement 60% des cas [220]. Sur 31 animaux atteints de péritonite spontanée d'évolution subaiguë, une formule sanguine non modifiée a été observée dans 65 % des cas [108]. En revanche, lors de péritonite aiguë ou suraiguë des modifications majeures du leucogramme (leucocytose, neutrophilie, neutropénie, déplacement à gauche) étaient plus fréquemment mises en évidence, dans 77 à 100 % des cas selon les données rapportées [59, 108].

Ces résultats sont comparables à ceux rapportés chez le chien : dans une étude portant sur 265 chiens, l'évaluation du nombre de leucocytes totaux était jusqu'à 6 fois moins sensible que la concentration en haptoglobine et en céruloplasmine pour la mise en évidence d'un syndrome inflammatoire [251].

## **IV.2 - MESURE DANS LE LAIT**

Pour la mise en évidence d'un foyer inflammatoire mammaire, les avantages de l'utilisation du lait par rapport au sang sont évidents : prélèvement plus facile, meilleure sensibilité et spécificité.

La quasi-totalité des mammites des bovins ont une origine infectieuse. Elles s'accompagnent, dans le cas de mammites cliniques, d'une modification de l'aspect macroscopique du lait et des signes cliniques de l'inflammation (douleur, chaleur, induration de la mamelle) et seulement d'une augmentation du CCS dans le cas de mammites subcliniques. Cependant certaines atteintes inflammatoires de la mamelle sont d'origine traumatique ou allergique, et d'autres, d'origine infectieuse, sont localisées (abcès) et n'entraînent pas d'altération macroscopique et/ou cytologiques du lait [161].

La sensibilité et la spécificité des tests utilisés (comptages cellulaires, protéines de la phase aiguë) sont habituellement établies par rapport à la bactériologie qui est considérée comme le test de référence. Cette approche a des limites en raison des différences de procédures pour la culture des bactéries, de l'existence bactéries au pouvoir pathogène différent, de la contamination potentielle du prélèvement...[27]. Les faux positifs par rapport à la bactériologie (diminution de la spécificité) sont en partie à relier à des défauts d'isolement des bactéries, à des mammites bactériologiquement guéries mais où persiste une inflammation tissulaire, ou à des mammites d'origine non bactérienne. Une partie des faux négatifs serait attribuée à des contaminations bactériennes du canal du trayon qui n'induisent pas de mammite, ou à une contamination du prélèvement. Les données rapportées sont donc hétérogènes.

### **IV.2.1 - Mammites cliniques**

Lors de mammite clinique, de nombreuses études expérimentales [109, 112, 115, 217] ou de terrain [40, 67, 69, 91, 161] ont montré l'existence d'une forte phase inflammatoire aiguë, avec l'élévation significative des PPA dans le plasma ou le sérum.

Lors de mammite, l'augmentation de la perméabilité capillaire et la destruction de l'épithélium mammaire conduit au passage de protéines et de cellules inflammatoires dans le lait. En théorie, toute protéine plasmatique se retrouvant dans le lait peut être utilisée comme

marqueur d'inflammation, du moment qu'elle ne subit pas de transport actif au travers de l'épithélium mammaire [161]. La sensibilité et la spécificité de l'haptoglobine, et de la SAA. (tableau 18) .

Tableau 18 : sensibilité, spécificité, VPP et VPN de la SAA, et l'Hp mesurées dans le lait, utilisées comme marqueurs de l'inflammation mammaire (mammites cliniques) chez les bovins (prévalence 50%).

| Paramètre | Seuils      | Se (%) | Sp (%) | VPP (%) | VPN (%) | Nombre | Référence |
|-----------|-------------|--------|--------|---------|---------|--------|-----------|
| Hp        | > 20 mg/l   | 86     | 100    | 100     | 88      | N = 29 | [69]      |
| SAA       | > 0.55 mg/l | 93     | 100    | 100     | 93      |        |           |

#### IV.2.2 - Mammites sub-cliniques

Le comptage des cellules somatiques du lait (CCS), et son application de terrain, le Californian Mastitis Test (CMT) demeurent à l'heure actuelle les techniques les plus employées pour détecter les mammites subcliniques.

Les résultats sont très variables d'une étude à l'autre et suivant le seuil de positivité choisi. Pour un seuil de 250 000 cellules/ml, valeur communément admise, la spécificité du CCS par rapport à la bactériologie (test de référence) est relativement élevée (entre 80 et 95 %). La sensibilité varie de 50 à 60 % à près de 100 % selon les auteurs [27, 56, 73, 99] (tableau 19). La pondération des résultats par des facteurs « démographiques » susceptibles d'influencer le CCS (âge, parité, stade de lactation, saison, moment du prélèvement...), permet une augmentation de la sensibilité du CCS [73].

Quelques études ont été menées afin de tester la valeur du comptage différentiel des cellules somatiques du lait (CCD = Comptage cellulaire différentiel) comme marqueur de mammites subcliniques [73, 113, 198]. Les résultats sont très variables selon les auteurs. Ainsi, la sensibilité est inférieure à 15% quel que soit le type de cellule choisi comme facteur discriminant (Se = 2,7 % pour les lymphocytes, 11,7 % pour les neutrophiles et 15,6 % pour les monocytes)[73]. La pondération par les facteurs démographiques n'apporte qu'une sensibilité maximale de 44%. Les meilleurs résultats sont obtenus en combinant les résultats du CCS et du CCD (tableau 19). Les valeurs discriminantes maximales sont obtenues avec le nombre de neutrophiles comme marqueur (Se = 33 à 44 % ; Sp = 77-90 %)

Tableau 19 : Sensibilité et spécificité (%), des paramètres cellulaires du lait utilisés pour la mise en évidence d'une inflammation mammaire subclinique chez les bovins.

| Paramètres     | Se (%) | Sp (%) | Nombre | Référence    |
|----------------|--------|--------|--------|--------------|
| CCS seul       | 50     | 94     | 1659   | <b>[73]</b>  |
| CCD seul       | < 15   | 95     |        |              |
| CCS pondéré    | 62     | 93     |        |              |
| CCS + CCD      | 65     | 93     |        |              |
| CCD (PMN)      | 33-44  | 77-90  | 142    | <b>[198]</b> |
| CCS > 800 000  | 63-96  | 85-94  | 234    | <b>[27]</b>  |
| CCS > 600 000  | 68-98  | 81-91  |        |              |
| CCS > 250 000  | 75-100 | 75-86  |        |              |
| CCS > 250 000  | 54     | 96     | 462    | <b>[56]</b>  |
| CCS > 225 000  | 63     | 93     |        |              |
| CCS > 200 000  | 72     | 85     |        |              |
| $\alpha_1$ -AT | 67     | 84     | 544    | <b>[161]</b> |

L' $\alpha_1$ -AT dans le lait est corrélée avec le CCS ( $r^2=0.766$ ), l'albumine du lait ( $r^2= 0.88$ ) **[116, 161]**. La spécificité (67%) et la spécificité (84%) par rapport à la bactériologie sont équivalentes à celles généralement obtenues pour le comptage cellulaire.

L'évaluation de la concentration en albumine du lait ne s'est pas montrée convainquante. Dans une étude portant sur 1011 prélèvements de lait au statut bactériologique connu (sains, infectés par des pathogènes mineurs, ou infectés par *Staphylococcus aureus*), l'utilisation de l'albumine comme marqueur de l'inflammation a conduit à une mauvaise classification de 44 % des prélèvements contre 17 % pour le CCS **[239]**.

### **IV.3 - PARAMETRES DU LCR**

La bactériologie du LCR est positive dans 40 à 60 % des atteintes bactériennes du système nerveux central des bovins [76, 90, 107, 128, 131, 232, 262]. La contamination lors du prélèvement peut être à l'origine de faux positifs.

L'analyse des paramètres cytologiques, associée au dosage des protéines totales du LCR semblent plus appropriée pour mettre en évidence une réaction inflammatoire du système nerveux central. Ainsi, dans une étude sur les méningites bactériennes du veau, confirmées par histologie de l'encéphale, une augmentation des protéines totales (>0,95 g/l) ou une pléïocytose neutrophilique marquée était observée dans le LCR de la totalité des animaux (n= 9) [234]. Sur un échantillon de 22 animaux, la sensibilité est de 59 % seulement pour les protéines totales mais 100 % pour les leucocytes [90].

Lors de listériose, confirmée par histologie du tronc cérébral, l'augmentation des protéines totales du LCR a permis de détecter 82 % et la leucocytose 80 % des cas [209]. L'analyse combinée de ces deux paramètres a cependant permis d'obtenir une sensibilité de 100 %. Des résultats similaires ont été rapportés pour diverses maladies à caractère inflammatoire chez les ovins [226] et lors de méningites bactériennes chez les bovins adultes [76].

Les seuils de positivité adoptés modifient évidemment la sensibilité et la spécificité des paramètres étudiés. Ainsi, une sensibilité de 86 % est obtenue pour l'analyse cytologique en utilisant une valeur seuil de 20 cellules/ $\mu$ L [76]. Si cette valeur est réduite à 10 cellules/ $\mu$ L, la sensibilité est de 100% . La spécificité, proche de 100 %, est peu modifiée.

Cependant, chez le veau, les valeurs usuelles diffèrent de celles établies chez l'adulte (protéines totales plus faibles et leucocytes plus nombreux (voir page 76). Les valeurs seuils devraient donc être adaptées en conséquence. Ceci n'a pu être réalisé ici, par manque d'information concernant l'âge des animaux, et l'absence de données suffisantes chez les jeunes bovins pour établir un intervalle de référence fiable.

### **IV.4 - PARACENTESE ABDOMINALE**

Lors de suspicion de péritonite et quelle qu'en soit la cause, l'analyse du liquide de ponction abdominale serait d'un grand intérêt diagnostique. Il semble en effet que cet examen

soit plus sensible que la numération formule sanguine ou que le dosage des protéines de la phase aiguë [108].

L'analyse du liquide péritonéal a permis de classer correctement 80 à 100 % des animaux selon qu'il soient ou non atteints de péritonite [108, 280]. Cette classification repose sur des critères différents selon les auteurs. Hirsch et Townsend (1982) [108] retiennent des seuils de 6000 cellules/ $\mu$ l et 30 g/l pour les protéines totales. Selon Wilson *et al.* (1985) [280], ces seuils sont inadaptés car plus de la moitié des animaux sains (n= 21) sont situés au dessus. Ils proposent donc de considérer comme positifs les prélèvements contenant moins de 10 % d'éosinophiles et plus de 40 % de neutrophiles. Selon ces critères, ils obtiennent une sensibilité de 100 % et une spécificité du même ordre par rapport à des vaches saines, gravides ou non. L'absence de comparaison avec d'autres troubles abdominaux susceptibles d'engendrer des modifications des paramètres du liquide péritonéal limite cependant la valeur discriminante de ces critères.

Ultérieurement, les seuils de 10000 cellules/ $\mu$ L et 30 g/l de protéines totales ont été retenus comme significatifs d'une inflammation du péritoine, permettant d'augmenter la spécificité aux dépens de la sensibilité [146, 147]. Celle-ci peut être cependant être améliorée si l'on considère les deux critères séparément : nombre de leucocytes supérieur à 10000/ $\mu$ l ou PT > 30g/l et non plus l'association des deux (tableau 20).

Tableau 20 : sensibilité, spécificité (%) des paramètres du liquide de ponction abdominale pour la mise en évidence d'une inflammation du péritoine chez les bovins.

| Critères   | Sensibilité | Spécificité | nombre | Référence            |
|--|-------------|-------------|--------|----------------------|
| <10 % éosinophiles<br><b>ET</b><br>> 40% neutrophiles  | 100 %       | 100 %       | 40     | <b>[280]</b>         |
| > 6000 leucocytes / $\mu$ L<br><b>ET</b><br>PT > 30g/l | 80 %        | 100 %       | 66     | <b>[108]</b>         |
| >10000 leucocytes / $\mu$ L<br><b>OU</b><br>PT>30g/l   | 100 %       | 92 %        | 66     | <b>[108]</b> modifié |

Ces valeurs ne sont applicables qu'aux bovins adultes, compte tenu des différences observées pour ces paramètres chez les veaux [9].

## **V - APPRECIATION DE L'ANCIENNETE**

Les études sur l'évaluation de l'ancienneté du processus inflammatoire sont limitées aux paramètres sanguins.

### **V.1 - NUMERATION FORMULE ET PROTEINES DE LA PHASE AIGUË**

Les différentes protéines de la phase aiguë peuvent être classées en trois groupes selon leur profil de décroissance plasmatique (cf supra). De même la formule sanguine évolue selon le stade évolutif de la réaction inflammatoire. En se basant sur ces modifications hématologiques et biochimiques, il semble donc *a priori* possible d'apprécier l'ancienneté d'une réaction inflammatoire.

Ainsi, la formule sanguine associée à une inflammation suraiguë sera caractérisée par une neutropénie plus ou moins marquée avec une déviation à gauche des neutrophiles et une lymphopénie transitoire. A un stade plus avancé (de 24 heures à quelques jours), on observera une neutrophilie avec présence ou non de cellules immatures, provoquant, dans la plupart des cas, une leucocytose. Des valeurs peu modifiées pour les leucocytes totaux, un degré variable de neutrophilie, une lymphopénie modérée ou parfois une lymphocytose, une monocytose et une éosinophilie modérée signeront plutôt une inflammation chronique.

Cependant la faible sensibilité des paramètres hématologiques (cf supra) et les grandes variations observées selon la cause du processus inflammatoire rendent souvent difficile la différenciation entre un phénomène aigu et chronique. Ainsi, pour 31 cas de péritonites généralisées aiguës (n= 12) ou chroniques (n=19) d'origines diverses, aucune discrimination entre les deux groupes n'a pu être faite sur des bases hématologiques [59]. De même, le nombre de leucocytes totaux, le nombre de neutrophiles, et celui des neutrophiles non segmentés ne se sont pas des critères satisfaisants pour différencier 31 cas d'atteintes aiguës de 50 cas d'inflammation chronique (tableau 21)[119].

Dans cette étude, les valeurs de la SAA, de l'Hp, de l' $\alpha_1$ -AGP et le nombre de neutrophiles non segmentés étaient significativement plus élevées lors de processus inflammatoires aigus que lors de phénomènes chroniques. Pour le nombre de leucocytes totaux et celui des neutrophiles matures, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence. Les auteurs ont ensuite cherché à savoir si une valeur élevée (supérieure aux valeurs

usuelles) pour un ou plusieurs de ces marqueurs était sensible et/ou spécifique de la réaction inflammatoire aiguë, permettant alors de faire la distinction avec les affections chroniques (valeurs non augmentées dans cette hypothèse)

Tableau 21 : Sensibilité, spécificité, pouvoir discriminant (%) du dosage des PPA et des paramètres hématologiques pour différencier les inflammations aiguës (N=31) des inflammations chroniques (N=50), d'après[119].

|   | SAA<br>>8.8 mg/l | $\alpha_1$ -AGP<br>>450 mg/l | Hp<br>>0.35 g/l | Leucocytes<br>totaux<br>>12.10 <sup>9</sup> /l | Neutrophiles<br>> 4.2.10 <sup>9</sup> /l | Band cells<br>> 0 |
|---|------------------|------------------------------|-----------------|--|--|-------------------|
| Sensibilité vis à vis de l'inflammation aiguë (%)     | <b>100</b>       | 89                           | 68              | 35   | 71                                       | 42                |
| Spécificité vis à vis de l'inflammation aiguë (%)     | 46               | 28                           | <b>76</b>       | 64   | 30                                       | <b>72</b>         |
| Pouvoir discriminant aigu <i>versus</i> chronique (%) | 67               | 50                           | <b>73</b>       | 46   | 46                                       | 60                |

Les paramètres hématologiques sont dans l'ensemble inexploitable pour cette distinction, car soit peu sensibles vis à vis de la réaction inflammatoire aiguë (band cells: 42%, leucocytes totaux : 35%), soit peu spécifiques de l'une ou de l'autre durée d'évolution (nombre de neutrophiles matures : spécificité de 30 %).

Parmi les protéines de la phase aiguë étudiées, l'haptoglobine aurait le pouvoir discriminant le plus fort, puisqu'elle permettrait de classer correctement 73 % des animaux selon la durée d'évolution de la maladie. En revanche, il faut souligner sa faible sensibilité vis à vis des affections aiguës (68 %) par ailleurs inférieure à celle obtenue par d'autres auteurs (tableau 17).

La concertation de la SAA est élevée dans de nombreux cas chroniques (27/50 soit 54 %). Cependant son augmentationsa systématique lors d'inflammation aiguë la rend intéressante.

L' $\alpha_1$ -AGP, bien que plus sensible (89%) que l'haptoglobine dans cette étude, ne permet pas de séparer les deux groupes de maladies (pouvoir discriminant de 50%). Ainsi, les concentrations étaient supérieures aux valeurs usuelles chez 72 % (36/50) des animaux atteints de façon chronique. Cette observation est à rapportée à la cinétique de décroissance très lente de ce marqueur (vcf supra) [41, 42, 110, 122, 176, 237].

L'analyse combinée de l'haptoglobine et de la SAA, permettrait ainsi, selon les auteurs, de bénéficier d'un pouvoir discriminant acceptable. Les interprétations suivantes pourraient être proposées, sur la base de cette étude et des profils cinétiques abordés précédemment :

- Haptoglobine et SAA augmentées : processus inflammatoire aigu.
- Haptoglobine augmentée et SAA normale : plutôt processus inflammatoire chronique.
- Haptoglobine normale et SAA augmentée : conclusion difficile : phénomène aigu ou chronique mais vraisemblablement de faible amplitude ou encore phénomène très récent.
- Haptoglobine et SAA normales : absence d'inflammation ou phénomène chronique, ou de très faible amplitude.

Les fluctuations des protéines de la phase aiguë lors de phénomène inflammatoire chronique se superposent probablement aux périodes de rémission et de réactivation du processus inflammatoire [259]. Si les phases de rémission sont suffisamment longues, les valeurs de la SAA et de l'haptoglobine peuvent être normales à très faiblement augmentées en raison des cinétiques assez rapides de ces deux marqueurs (retour aux valeurs usuelles dans les 6 à 8 jours pour la SAA et 8 à 12 jours pour l'Hp). En revanche L' $\alpha_1$ -AGP apparaît comme un marqueur intéressant étant donné son temps de demi vie très long.

## **V.2 - PROTEINES TOTALES SÉRIQUES**

Le dosage des protéines totales sériques peut être d'une grande utilité pour la mise en évidence d'une inflammation chronique. En effet, la quasi-totalité des affections inflammatoires des bovins (infectieuses, ou immuno-induites) ont un caractère immunogène ; les inflammations d'origine chimique ou physique (brûlures, irradiations) sont exceptionnelles chez les bovins. Les hypergammaglobulinémies sont donc quasiment toujours observées, dès lors que le temps nécessaire à la production d'anticorps est écoulé. Ce laps de temps peut être mis à profit pour différencier les processus inflammatoires aigus et chroniques. La concentration sérique en protéines totales est par ailleurs un bon indicateur des concentrations des globulines, en dehors des maladies entraînant de fortes pertes en albumine (amyloïdose rénale, paratuberculose...). A ce titre l'utilisation du ratio albumine / globulines

est intéressant pour mettre en évidence les hyperglobulinémies vraies. Selon Liberg (1977) [151] une augmentation des concentrations des  $\alpha$ - , des  $\beta$ - et des  $\gamma$ -globulines est observée dans la totalité des affections chroniques d'origine infectieuse, alors qu'en présence d'un phénomène aigu, seules les  $\gamma$ -globulines sont augmentées. Sur le plus quantitatif, l'augmentation des  $\alpha$ - et  $\beta$ -globulines est beaucoup plus faible que celle des  $\gamma$ -globulines. La concentration des globulines totales reste peu modifiée en phase aiguë.

Le temps de demi-vie des  $\gamma$ -globulines étant long [126] une persistance de concentrations élevées peut être observée plusieurs semaines après la résolution de la réaction inflammatoire. Ceci pourrait être à l'origine de faux positifs (diminution de la spécificité).

## **VI - SUIVI THERAPEUTIQUE ET POST-OPERATOIRE ; PRONOSTIC**

Chez l'homme, les PPA sont de plus en plus largement utilisées afin d'apprécier de façon objective l'efficacité ou la non efficacité d'un traitement médical ou chirurgical [74, 259]. Chez les bovins les études sont encore peu nombreuses, mais les perspectives sont nombreuses. Ceci requiert l'utilisation de marqueurs sensibles à de faibles variations de l'intensité du processus inflammatoire et à demi-vie brève. Les concentrations des PPA reflètent assez bien la sévérité du processus inflammatoire d'un point de vue clinique ou nécropsique (voir page 100 et suivantes). Dans une moindre mesure, les paramètres hématologique peuvent aussi servir de marqueurs. Comme chez l'homme [20, 143, 259], l'évaluation de ces différents paramètres sanguins pourrait être utilisée sur le plan pronostic.

### **VI.1 - MARQUEURS SANGUINS**

#### **VI.1.1 - Suivi cliniques et pronostic**

Lors de mammite expérimentale à *E. coli* la concentration en haptoglobine baisse rapidement et retourne à des valeurs usuelles en 5 jours après l'inoculation pour les vaches qui répondent positivement aux traitements anti-infectieux et anti-inflammatoires instaurés[112]. Chez les animaux plus gravement touchés et succombant ou étant euthanasiés en raison de

leur mauvais état général, la concentration en haptoglobine demeure élevée (supérieure à 500 mg/l) beaucoup plus longtemps, entre 10 et 15 jours post-infection PI.

Lors de métrite post-partum aiguë, la diminution de concentration plasmatique en haptoglobine est plus rapide et plus prononcée chez les animaux qui répondent rapidement au traitement comparés à ceux qui nécessitent une thérapeutique plus agressive pour guérir[247].

Une diminution des concentrations en haptoglobine est observée par Wittum *et al.* (1996) [282] lors de la mise en place d'un traitement antibiotique chez des jeunes bovins souffrant de broncho-pneumonies infectieuses.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez le porc lors de traitement d'affection à *Actinobacillus pleuropneumoniae* : la concentration sérique en haptoglobine des animaux traités retournait à des valeurs normales beaucoup plus tôt que celles des animaux non traités (44 heures contre 13 jours). De plus une forte corrélation existait entre ces concentrations et le nombre de jours de signes cliniques d'atteinte respiratoire [103].

Lors de mammites, d'arthrite ou de pneumonie tous les animaux (n= 8) ayant été soignés avec succès montraient des valeurs en  $\alpha_1$ AGP inférieures à 450 mg/l 15 jours après le début du traitement. Pour les animaux qui en revanche ne répondaient pas favorablement (mêmes maladies, n=8) les valeurs restaient supérieures à 1 g/l pendant la même période [122].

De même le fibrinogène voit sa concentration plasmatique diminuer dans un délai de 8 à 30 jours après le traitement de mammites colibacillaires [70]. En revanche, lors de pyélonéphrite, la persistance de valeurs de fibrinogène supérieures à 12 g/l malgré la mise en place d'une thérapeutique agressive est d'un mauvais pronostic, alors que l'on observe une diminution lente mais nette de ces valeurs lorsque l'issue est favorable (observations personnelles).

Plusieurs auteurs ont proposé des valeurs seuils au-delà desquelles le pronostic vital serait réservé. Pour l'haptoglobine, cette valeur serait de 1 g/l [102, 110, 245]. Pour la SAA, la valeur de 60 mg/ml a été proposée [102]. Des concentrations en  $\alpha_1$ -AGP supérieures à 1 à 1,2 g/l, persistant plus de 5 jours, seraient d'un mauvais pronostic [122]. De même, lors de processus inflammatoire chronique, des concentrations plasmatiques en fibrinogène supérieures à 12-14 g/l seraient presque toujours associées à une issue fatale, quelque soit la cause du processus inflammatoire [70].

La valeur pronostique des concentrations des PPA dépend du moment où la mesure est réalisée. Lors d'inflammation aiguë, des valeurs très élevées dans les deux premiers jours de l'apparition des symptômes est d'un mauvais pronostic. En revanche, des valeurs inférieures aux valeurs seuils citées ci-dessus ne laisse en rien présager des valeurs à venir. Idéalement, le dosage doit se faire au pic de concentration plasmatique, ce qui implique de connaître la date d'apparition de la maladie. Celle-ci ne correspond, hélas !, que rarement avec la date de première observation des symptômes.

Dans la pratique, l'utilisation de l'haptoglobine et, peut être, de la SAA comme marqueur de l'évolution clinique du patient, semble prometteuse. Leur demi-vie brève et leur grande sensibilité aux variations d'intensité de la réaction inflammatoire augurent de leur permettrait d'intérêt dans le suivi clinique et thérapeutique. Dans cette optique, la validation du dosage de la SAA paraît importante, puisqu'elle bénéficie de la plus forte sensibilité et de la cinétique la plus rapide. En revanche, le dosage de l' $\alpha_1$ -AGP et du fibrinogène apparaissent d'intérêt plus limité dans le suivi thérapeutique quotidien en raison de leur cinétique lente mais peuvent fournir des valeurs pronostiques utiles.

Les corticoïdes entraînent une forte perturbation du leucogramme ainsi qu'une augmentation de la concentration en haptoglobine, rendant délicat l'interprétation des résultats lors d'utilisation de ces anti-inflammatoires.

### **VI.1.2 - Suivi post-opératoire**

L'utilisation des marqueurs de l'inflammation dans le suivi post-opératoire nécessite de connaître l'effet de l'intervention chirurgicale elle-même sur ces marqueurs. En particulier le traumatisme tissulaire, le caractère immunogène et inflammatoire du matériel chirurgical (fils, prothèses...), sont susceptibles d'avoir des répercussions sur les valeurs observées, en dehors de toute complication. Chez l'homme ces paramètres sont bien maîtrisés et de nombreuses publications y sont consacrées. Les concentrations plasmatiques en CRP et en  $\alpha_1$ -antichymotrypsin étaient considérablement augmentées chez des patients souffrant de complications infectieuses alors qu'elles étaient peu modifiées chez les patients sans complications [235]. La SAA a aussi été proposée comme marqueur très précoce de rejet lors de greffe rénale [100].

Chez les bovins, l'intérêt de la numération formule sanguine est difficile à apprécier

[201]. Lors de syndromes d'Hoflund consécutif à la correction chirurgicale de torsion/volvulus de la caillette, le nombre de neutrophiles était significativement plus élevé ( $P=0.02$ ) pour les animaux souffrant de péritonite localisée ou généralisée par rapport aux autres [218]. Ces mesures ont été réalisées entre le 2<sup>e</sup> et le 14<sup>e</sup> jour post-opératoire selon les cas.

Le fibrinogène et l'haptoglobine pourraient servir de marqueurs de complications septiques post-opératoires.

Les concentrations plasmatiques en fibrinogène semblent peu affectées par l'acte chirurgical. En l'absence de complication post-opératoire, aucune variation significative de la fibrinogénémie n'a été observée sur 97 animaux ayant subi diverses interventions abdominales. Dans le cas où les concentrations préopératoires sont élevées (réticulopéritonite traumatique par exemple), une diminution lente a été mise en évidence à partir du deuxième ou du troisième jours post-opératoire [111].

L'haptoglobine sérique augmente consécutivement aux actes chirurgicaux. Sa concentration sérique est maximale 2 à 3 jours après l'intervention [111]. Cette augmentation reste cependant faible puisque la concentration maximale était de 0.37 g/l HbBC, inférieure à la valeur seuil de 0.4 g/l HbBC au-dessus de laquelle un phénomène septique est probable [245]. En l'absence de complication, une diminution rapide est ensuite observée à partir du 4<sup>e</sup> jour. Dans cette étude, 7 jours après l'intervention, les concentrations étaient très significativement réduites mais restaient cependant encore au-dessus des valeurs usuelles.

L'utilisation pratique du fibrinogène et de l'haptoglobine dans le suivi postopératoire nécessiterait un dosage préopératoire. Le deuxième dosage se ferait entre le 2<sup>e</sup> et le 3<sup>e</sup> jour après l'intervention. Des valeurs élevées par rapport au premier prélèvement suggéreraient des complications septiques. Des mesures répétées dans les 10 jours suivants permettraient alors de suivre la réponse au traitement mis en œuvre. Dans tous les cas, une troisième évaluation est conseillé vers 7-8 jours pour s'assurer de la baisse significative des valeurs.

Le dosage de l' $\alpha_1$ -AGP dans le post-partum immédiat semble moins intéressant, étant donné sa cinétique plus lente. Le pic de concentration plasmatique est atteint entre 3 et 7 jours (valeurs comprises entre 0.45 g/l et 1.2 g/l) après une intervention chirurgicale non compliquée. Il faut attendre 10 jours pour qu'une baisse significative soit observée. L'existence de valeurs supérieures à 1g/l au dixième jour postopératoire semble signer la présence de complications infectieuses [122].

Lors de suivi à long terme (>15 jours), pour évaluer l'existence de complications chroniques, le dosage simultané du fibrinogène et de l' $\alpha_1$ -AGP paraît potentiellement préférable à celui de la SAA ou de l'Hp. Les données expérimentales font cependant défaut pour étayer cette hypothèse.

L'évaluation des protéines totales sériques semblent peu utile dans le suivi post-opératoire [111].

## **VI.2 - MARQUEURS DU LAIT**

Le CCS et l' $\alpha_1$ -Antitrypsine ont été utilisés comme marqueurs de guérison dans le suivi thérapeutique des mammites cliniques [203]. Les cinétiques d'évolution de ces marqueurs diffèrent, selon qu'il y a ou non guérison bactériologique (voir supra). Lors de guérison bactériologique, la normalisation des valeurs est obtenue entre 15 jours (CCS) et 3 semaines ( $\alpha_1$ -Antitrypsine) post-infection [202]. En revanche les valeurs restent élevées lors de la persistance d'une infection intra-mammaire. Ces longs délais sont difficilement compatibles avec une application pratique.

Nous avons vu que les concentrations en SAA et l' $\alpha_1$ -Antitrypsine du lait étaient liées à l'intensité du processus inflammatoire lors de mammite. Cependant, à l'heure actuelle, il ne semble pas y avoir de données publiées mettant en évidence une potentielle valeur pronostique de ces marqueurs.

## **VI.3 - MARQUEURS DU LCR**

Chez l'homme, l'évaluation du nombre de leucocytes totaux et les concentrations en protéines totales, albumine,  $\alpha_1$ -AGP, Céruloplasmine, Haptoglobine,  $\alpha_1$ -PI et CRP du LCR peut être utilisée dans le suivi des méningites bactériennes [192]. La rémission des symptômes s'accompagne d'une diminution marquée des valeurs de ces différents marqueurs. Cependant, quel que soit le paramètre, sa concentration initiale dans le LCR ne permet pas de classer les patients suivant l'issue de la maladie (rémission complète, issue fatale et rémission avec complications). De plus, le suivi clinique n'est pas amélioré par rapport à l'analyse des paramètres sanguins. En raison de son caractère invasif et de sa difficulté technique, l'analyse du LCR est peu utilisée en routine dans le suivi des patients. Chez les ruminants, des résultats similaires ont été rapportés pour les paramètres cytologiques et la concentration en protéines totales du LCR concernant la listériose [229].

#### **VI.4 - MARQUEURS DU LIQUIDE DE PONCTION ABDOMINALE**

Chez les chevaux, l'analyse du liquide de ponction abdominale ne s'est pas révélée très intéressante dans le suivi postopératoire lors d'entérectomie [98].

Chez les bovins, la cinétique de différents paramètres (protéines totales, densité, nombre de cellules nucléées, et comptage cellulaire différentiel) a été établie suite à la laparotomie exploratrice et l'omentopexie rétrocostale droite [10]. Le nombre de neutrophiles, de lymphocytes, et de cellules mononucléées augmente à partir du 2<sup>e</sup> jour postopératoire jusqu'au 6<sup>e</sup> jour. Le nombre d'éosinophiles est significativement augmenté au 6<sup>e</sup> jour. Le taux de protéines totales (PT) est significativement plus élevé dès le deuxième jour postopératoire jusqu'au 6<sup>e</sup> jour, par rapport aux valeurs observées avant l'intervention.

Cependant, les auteurs insistent sur le fait que les valeurs obtenues sont extrêmement variables d'un animal à l'autre et qu'elles sont influencées par le stade de gestation, ce qui rend difficile l'interprétation des résultats.

La comparaison du liquide de ponction abdominale chez des animaux atteints ou non de complications postopératoires et l'appréciation de l'éventuel intérêt de cette procédure n'a pas été étudiée, à notre connaissance, chez les bovins.

## VII - ORIENTATION CAUSALE

L'un des critères de définition d'un marqueur de l'inflammation stipule que sa variation doit être "indépendante de l'étiologie du syndrome inflammatoire" [96].

Chez l'homme, cependant, il est communément admis que l'augmentation des concentrations plasmatiques de la SAA et de la CRP est moins marquée lors d'infection virale que lors d'infection bactérienne, fongique ou de trauma [74, 200, 259, 266, 283]. Selon Yamada (1999) [283], une distinction peut être faite entre les atteintes virales d'une part, bactériennes, fongiques ou traumatiques d'autre part, sur la base des concentrations plasmatiques de la CRP et de la SAA [283] (figure 16). L'impact de la cause sur les marqueurs de l'inflammation mérite donc d'être étudié.

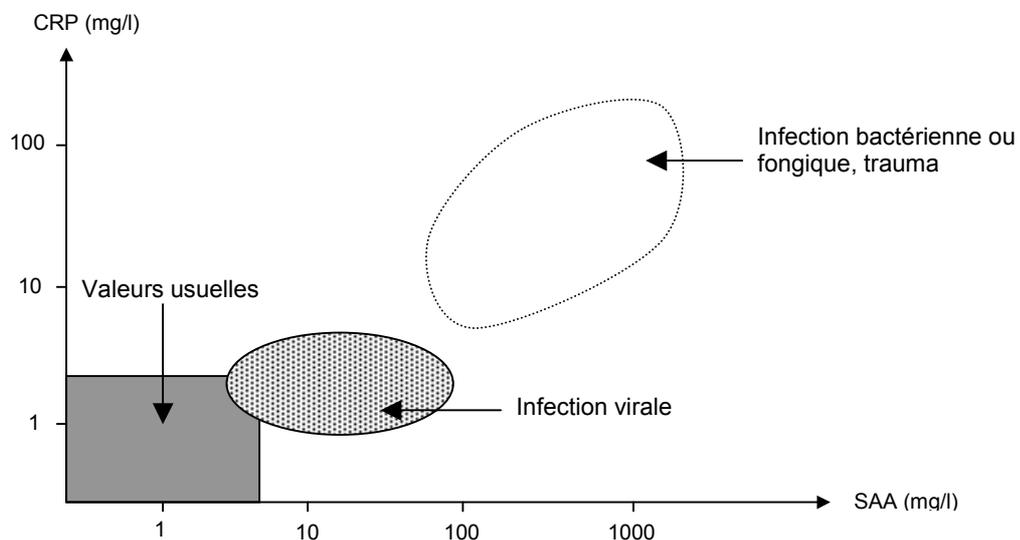


Figure 16 : concentrations plasmatiques en SAA et CRP en fonction de la nature du processus infectieux, d'après [283].

## VII.1 - PARAMETRES SANGUINS

La majorité des études concernent des inflammations d'origine infectieuses, principalement, sinon exclusivement, bactérienne (dont les endotoxines bactériennes). Rares sont les données sur les infections virales, parasitaires, et les inflammations aseptiques (injection de produits fortement irritants localement tels l'oxytétracycline, traumatismes osseux ou musculaires) et les affections tumorales.

Les inflammations d'origine bactérienne, provoquent des modifications de l'hémogramme et des concentrations des PPA, qu'il s'agisse d'affections localisées (mammites, abcès, pneumonies...), ou de maladies diffuses (septicémie, endotoxémie). De plus les modifications des paramètres hématologiques et des PPA seront sensiblement identique quelle que soit la localisation de l'affection.

La lymphopénie lors d'infection virale n'est que transitoire et non spécifique [17, 71]. L'orientation entre une cause virale ou bactérienne sur des bases hématologiques est impossible.

Pendant longtemps il a été admis que les concentrations des protéines de la phase aiguë étaient peu perturbées lors d'infections virales chez les bovins[245, 252]. Lors d'infection expérimentale par le Virus Respiratoire Syncytial Bovin, des augmentations importantes de l'haptoglobine (jusqu'à 10 g/l) et de la SAA (jusqu'à 80 mg/ml) lors ont été cependant mises en évidence [102]. Toutefois, les valeurs d'haptoglobine et de SAA ne sont pas discriminantes entre une infection pulmonaire virale et bactérienne. L'infection par le virus de la fièvre aphteuse provoquerait une augmentation significative des concentrations sériques en haptoglobine [114].

Des résultats similaires ont été également observés chez le chat lors de péritonite infectieuse féline (coronavirus) [11] et chez le porc lors d'infections à *Actinobacillus pleuropneumoniae* et par le PRRSV (arterivirus) [11, 103].

Dans certaines infestations parasitaires, les marqueurs de l'inflammation sont aussi augmentés : une hyperfibrinogénémie est fréquente lors de dictyocaulose massive (observations personnelles). L'infestation de bovins Prim'Holstein naïfs par *Theileria annulata* provoque une forte augmentation de la concentration en  $\alpha_1$ -AGP, mais de très faibles variations de l'haptoglobine et de la SAA [85, 86].

Lors de tumeurs lymphoïdes, l'examen hématologique permet dans certains cas la mise en évidence d'une lymphocytose maligne, avec parfois la présence de cellules anormales. Les concentrations sériques des PPA, comme l' $\alpha_1$ -AGP, semblent aussi être affectées [124].

Lors d'atteinte mammaire, l'analyse de l'hémogramme apporte des éléments pour différencier les mammites cliniques causées par des bactéries Gram positif (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Acrcanobactérium pyogenes*) des mammites causées par des bactéries Gram négatif (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Enterobacter spp.*) [248]. L'infection par des bactéries Gram négatif est à l'origine initialement d'une leucopénie avec neutropénie et monocytopénie, tandis que la formule numération sanguine est peu modifiée lors d'atteinte par les bactéries Gram positif. L'utilisation du nombre de neutrophiles segmentés (pourcentage < 35 % des leucocytes totaux) comme marqueur discriminant pour différencier les mammites à bactérie Gram négatif des mammites à bactéries Gram positif conduit à une sensibilité de 87 %, une spécificité de 71 %, et une VPP de 75 % (prévalence de 50%).

L'apport des marqueurs sanguins dans le diagnostic étiologique de l'inflammation chez les bovins apparaît cependant limité.

## **VII.2 - MARQUEURS DU LCR**

Lors de troubles nerveux centraux, les marqueurs de l'inflammation dans le LCR peuvent être exploités afin de préciser l'étiologie (tableau 22).

### **VII.2.1 - Atteintes inflammatoires versus atteintes non inflammatoires**

Les atteintes centrales d'origine infectieuse (bactériennes, virales ou parasitaires), tumorale et traumatique, responsables d'une réaction inflammatoire peuvent être distinguées des atteintes nerveuses d'origine métabolique, toxique, nutritionnelle ou congénitale [76, 226]. Les premières sont accompagnées de modifications, à des degrés divers, d'un ou de plusieurs des marqueurs de l'inflammation, tandis qu'aucune variation des marqueurs n'est observée dans le second groupe.

Certaines maladies font cependant exception :

- la polioencéphalomalacie (nécrose du cortex cérébral) est une maladie nutritionnelle (carence en vitamine B<sub>1</sub>). Une augmentation de la cellularité (pléiocytose monocytaire) est observée, sans augmentation des protéines totales (tableau 24) [76, 77, 226, 262].
- La tremblante du mouton et l'encéphalopathie spongiforme bovine n'engendrent pas de modifications cytologiques, ni d'augmentation des protéines totales, ni de variation des différentes fractions de globulines du LCR [226, 230, 231, 233]. L'intégrité de la barrière hémato-méningée est respectée (concentration du LCR en albumine identique pour les vaches atteintes et les vaches saines) ; il n'y a pas de production intrathécale d'immunoglobulines [233].
- La coccidiose nerveuse est rarement accompagnée de modifications des paramètres inflammatoires du LCR. Dans certains cas cependant une augmentation du nombre de cellules mononucléées pourra être observée [262].
- Lors de rage, le LCR est généralement normal.

### **VII.2.2 - Atteintes inflammatoires**

En revanche il apparaît que la distinction entre les diverses causes inflammatoires est délicate, en dehors des processus néoplasiques [107].

Les atteintes traumatiques sont caractérisées par une légère pléiocytose avec une majorité de macrophages et de monocytes, chargés d'éliminer les débris tissulaires [76, 77, 262]. Les hémorragies, fréquemment associées, seront mise en évidence par la xanthochromie et/ou des images de phagocytose des globules rouges.

Bien que peu documentées chez les ruminants, les atteintes virales du système nerveux central (coryza gangreneux- herpesvirus, maladies des muqueuses- pestivirus, Visna et Arthrite Encéphalite Virale Caprine - lentivirus) semblent caractérisée par une pléiocytose mononucléée (lymphocytes puis monocytes et macrophages) [43, 71, 76, 144, 262]. Malgré la forte production intrathécale d'immunoglobulines au bout de quelques jours, l'augmentation des protéines totales reste généralement faible. L'intégrité de la barrière hémato-méningée étant peu affectée, l'albumine plasmatique ne diffuse pas ou peu dans le LCR, et ne peut donc participer à l'augmentation des protéines totales [43].

Tableau 22 : Données fournies par l'analyse du LCR dans diverses atteintes du système nerveux central chez les bovins et les ovins (adapté et complété d'après [262]).

| Maladie  | Protéines totales (g/l) | Leucocytes / $\mu$ l | Type cellulaire dominant     |
|--|-------------------------|----------------------|------------------------------|
| Valeurs usuelles bovins sain                               | 0.23 - 0.66             | 0 - 9                | Lymphocytes                  |
| Abcès de l'encéphale                                       | 5.0                     | 20                   | Neutrophiles                 |
| Abcès de encéphale   | 0.40-8.96               | 2-14400              | 72-81% neutrophiles          |
| Abcès moelle épinière <sup>1</sup> (ovins)                 | 2.68 $\pm$ 0.41         | 220 $\pm$ 100        | Mononucléaires               |
| Leptoméningite suppurée                                    | 2.0                     | 75- milliers         | Neutrophiles                 |
| Méningoencéphalite bactérienne                             | 0.83-1.61               | 226-8300             | 44-90% Neutrophiles          |
| Méningoencéphalite bactérienne <sup>3</sup>                | 0.1-4.0                 | 5-14360              | 47 % monocytes               |
| Méningoencéphalite bactérienne <sup>6</sup>                | 0.95-7.1                | 50-12600             | 63-100 % neutrophiles        |
| Méningoencéphalite bactérienne chronique                   | 0.35-4.90               | 80-1297              | 60-98% mononucléaires        |
| Méningite à E. coli  | ND                      | 2400                 | 80% neutrophiles             |
| Méningites à E. coli <sup>2</sup>                          | 0.2-2.7                 | 130-23700            | Neutro ou mononucléaires     |
| Méningites à E. coli <sup>5</sup>                          | 1.96-7.67               | 168-667              | Neutrophiles                 |
| Méningite à Steptocoques                                   | ND                      | 100-200              | Neutrophiles                 |
| Méningoencéphalite (H. sommus)                             | augmentées              | augmentés            | Neutrophiles                 |
| Listériose   | 0.15-1.38               | 4 – 306              | 60-90 % mononucléaires       |
| Listériose <sup>4</sup>                                    | 0.21-1.41               | 1 – 332              | Mononucléaires               |
| Listériose <sup>3</sup>                                    | 0.3-1.92                | 4 – 215              | 72 % Monocytes               |
| Leptoméningite tuberculeuse                                | 3.0-15.0                | 100-1000             | Mixte                        |
| Maladies virales ( <i>non précisées</i> )                  | ND                      | 25 – 100             | Mononucléaires               |
| Encéphalites virales <sup>3</sup> (BVD, MCF, rage)         | 0.38-1                  | 7 – 26               | Monocytes                    |
| Encéphalites virales <sup>3</sup> ( <i>non précisées</i> ) | <2                      | < 100                | 75-100 % lymphocytes         |
| Encéphalite visna <sup>8</sup> (ovins)                     | 1                       | 80 – 136             | Mononucléaires               |
| Toxoplasmose   | 0.60                    | 30                   | 97% lymphocytes              |
| Encéphalite traumatique                                    | 0.42                    | 70                   | Mononucléaires               |
| Encéphalite traumatique <sup>3</sup>                       | 0.72-1.7                | 7 – 18               | Mononucléaires (macrophages) |
| Hématome cervical  | 2.18                    | 128                  | ND                           |
| Polioencéphalomalacie                                      | ND                      | 25 – 100             | Mononucléaires               |
| Polioencéphalomalacie                                      | 0.05-0.58               | 3 – 38               | ND                           |
| Polioencéphalomalacie <sup>1</sup> (ovins)                 | 0.2 $\pm$ 0.15          | 80 $\pm$ 60          | 68 $\pm$ 21 % Lymphocytes    |
| Polioencéphalomalacie <sup>3</sup>                         | 0.17-0.32               | 1.6 – 280            | Mononucléaires               |
| Maladie  | Protéines totales (g/l) | Leucocytes / $\mu$ l | Type cellulaire dominant     |

|                                    |              |           |                          |
|------------------------------------|--------------|-----------|--------------------------|
| Coenurose <sup>1</sup> (ovins)     | 1.1          | 1400      | 89 % éosinophiles        |
| Coenurose <sup>7</sup> (ovins)     | Ig augmentés | 200 – 600 | 40 % mono ; 36 % éosino. |
| Méningiome                         | 0.35         | 11        | ND                       |
| Tumeurs colonne vertébrale         | 0.16-3.80    | 0 – 35    | Lymphocytes anormaux     |
| Processus néoplasique <sup>3</sup> | 0.25-2.32    | 2 – 168   | 40 % lymphocytes         |

1 : Scott, 1992 [226]

2: Green et Smith (1992)[90]

3 : Ferouillet *et al.* (1998)[77]

4 : Rebhun et DeLahunta, (1982)[209]

5 : Nazifi *et al.* (1997)[183]

6 : Scott et Penny (1993) [234]

7 : Doherty *et al.* (1989) [54]

8 : Constable *et al.* (1996) [43]

Les encéphalites et les méningo-encéphalites bactériennes, à l'exception de la listériose, s'accompagnent au début d'une pléiocytose neutrophilique marquée (généralement plus de 70 -80 % des leucocytes) mais dont l'ampleur est extrêmement variable. Des valeurs de plus de 20 000 leucocytes par microlitre sont rapportées tandis que dans certains cas moins d'une cinquantaine de cellules sont présentes (tableau 24) [76, 90, 234, 262]. Il en est de même pour les variations des protéines totales, très augmentées lors de méningo-encéphalites bactériennes chez le veau (valeurs fréquemment supérieures à 1g/l), mais inférieures à 0.6 g/l dans de nombreux cas de listériose [209, 229, 234]. Au bout de quelques jours d'évolution, le type cellulaire dominant est représenté par les monocytes et les macrophages [76, 90, 262].

Lors de listériose une pléiocytose mononucléée (lymphocytes et monocytes, représentant entre 60 et 90 % des leucocytes du LCR) est observée, mais la cellularité globale reste peu agmentée [76, 209]. On observe cependant parfois une pléiocytose neutrophilique [26].

Les affections parasitaires du système nerveux central de ruminants sont à l'origine des plus fortes pléiocytozes éosinophiliques rencontrées [54, 226, 262]. Certains processus néoplasiques, de même que la rage, peuvent aussi être associés à une proportion d'éosinophiles augmentée.

La mise en évidence d'une pléiocytose lymphocytaire et la présence de lymphocytes anormaux devra orienter le diagnostic vers un processus néoplasique. Le lymphosarcome, est rarement associé à des modifications cytologiques, en raison de sa position extradurale [210, 262]. Les cas où des lymphocytes tumoraux sont cependant mis en évidence correspondent à une infiltration maligne de la moelle épinière [76].

Cependant les modifications cytologiques et des protéines totales sont peu spécifiques, parfois moyennement sensibles et évoluent avec le temps. Dans tous les cas, l'examen cytologique doit être associé au dosage des protéines totales pour en augmenter la valeur discriminante. Une pléiocytose monocytaire est observée dans la plupart des maladies au bout de quelques jours (encéphalites bactériennes, listériose, abcès, traumatisme, atteinte virale, ou encore polioencéphalomalacie). Le dosage des protéines totales permet de distinguer la polioencéphalomalacie des atteintes bactériennes, l'observation de nombreuses images d'érythrophagocytose oriente plutôt vers un traumatisme, mais la puissance du test reste limitée dans les autres cas.

La spécificité de pléiocytose neutrophilique vis à vis des atteintes bactériennes est élevée, supérieure à 95 % [262]. Cependant sa sensibilité est faible.. Seulement 63 % de méningite bactérienne chez des veaux (n= 22) étaient associées à une pléiocytose neutrophilique, les autres cas étant associés à une pléiocytose mononucléaire [90]. Ainsi la spécificité est fortement réduite quand la maladie évolue depuis quelques jours [226].

Les traitement anti-infectieux, lors d'atteinte bactérienne réduisent, considérablement le nombre de leucocytes présents dans le LCR, ce qui sert d'indicateur thérapeutique chez l'homme [128]. La pléiocytose neutrophilique évolue aussi plus rapidement vers une population mixte, voire à dominante mononucléée. L'analyse du LCR doit donc être réalisée avant tout traitement anti-infectieux, sous peine de voir encore diminuer sa sensibilité et sa spécificité.

Le dosage des protéines de la phase aiguë dans le LCR semble un outil diagnostique prometteur, comme le montrent plusieurs études réalisées chez l'homme. Le ratio haptoglobine du LCR / haptoglobine sérique serait plus élevé lors d'atteinte virale que lors d'atteinte bactérienne [185]. Le dosage de la céruloplasmine s'est révélé utile pour différencier les méningites bactériennes et virales dans 93 % des cas [192]. Des concentrations en CRP supérieures à 100µg/l dans le LCR seraient associées à des méningites bactériennes, plutôt que virales (sensibilité 100 %, spécificité 90 %). Les concentrations en SAA, bien que très élevées dans les deux types de méningites, n'auraient qu'un très faible pouvoir discriminant [242].

### **VII.3 - LIQUIDE DE PONCTION ABDOMINALE**

Diverses atteintes des organes abdominaux ont directement ou indirectement un caractère inflammatoire : , atteintes du tractus digestif (déplacement de la caillette, torsion du mésentère, du caecum, intussusception, réticulopéritonite traumatique), atteintes utérines (perforation, métropéritonite) ou de la vessie, hépatites, néphrites ou pyélonéphrites, processus néoplasiques... Quelques études ont été menées afin de savoir quel pouvait être l'apport de l'analyse du liquide péritonéal dans le diagnostic causal des péritonites.

Les déplacements ou torsions de la caillette, les dilatations ou torsions du caecum sont associés au bout de quelques jours à une augmentation du nombre de leucocytes totaux où prédominent des neutrophiles (de 60 à 75 %). L'observation de ces modifications sera fonction de la gravité de l'atteinte (torsion ou volvulus *versus* déplacement ou dilatation simple) et de la durée d'évolution [186].

Lors d'uopéritoine, la comparaison des concentrations de l'urée et de la créatinine du prélèvement avec l'urémie et la créatininémie, permet le diagnostic [147]. Dans les cas avancés, une péritonite chimique par irritation se développe et les polynucléaires neutrophiles sont majoritairement représentés [186].

L'observation de neutrophiles dégénérés et/ou de bactéries oriente le diagnostic vers une péritonite septique faisant suite soit à une obstruction intestinale par intussusception ou torsion [44] soit à une chirurgie. Lors de réticulopéritonite traumatique d'évolution récente, ces modifications peuvent parfois être observées. La présence de fibres alimentaires est un bon indicateur de perforation d'un organe digestif (intestin, caillette)[108, 147, 186, 280].

Les processus néoplasiques s'accompagnent d'une quantité variable de liquide péritonéal selon la localisation, la nature et l'extension du phénomène. La teneur en protéines totales est rarement augmentée et la cellularité souvent élevée. C'est principalement sur la mise en évidence de cellules tumorales que repose le diagnostic [186, 280].

Malgré les informations apportées par l'examen du liquide de ponction abdominale, il semble difficile de différencier les causes d'inflammation. Les modifications induites par les réticulopéritonites traumatiques sont fréquemment identiques à celles observées dans les péritonites par irritation ou le péritonites non-infectieuses (déplacements de la caillette...). Dans la majorité des cas, les neutrophiles prédominent, et une augmentation des protéines

totales est observée. La combinaison de ces caractéristiques et d'une concentration en protéines totales sériques supérieure à 80g/l [58], ou d'une concentration plasmatique en haptoglobine supérieure à 1 g/l [111] permettrait de diagnostiquer avec peu d'erreur une réticulopéritonite traumatique.

#### **VII.4 - MARQUEURS DU LAIT**

De nombreuses études ont montré que le CCS était plus élevé lors de mammites chroniques causées par des Pathogènes majeurs (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* et *S. agalactiae*, *S. uberis*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Actinomyces pyogenes*) que lors de mammites causées par des pathogènes mineurs (*Corynebacterium bovis*, *Staphylocoques Coagulase-négatifs*) [13, 57, 99, 276]. Dès le premier jours post-infection, les valeurs du CCS sont généralement supérieures à 1 à  $5 \cdot 10^6$  cellules/ $\mu$ l lors d'isolement de pathogènes majeurs alors qu'elles sont inférieures à  $10^6$  cellules/ $\mu$ l dans le cas des pathogènes mineurs.

Cependant, le diagnostic étiologique repose principalement sur la bactériologie. C'est pourquoi, l'évaluation de la plupart des marqueurs de l'inflammation du lait n'a pas fait l'objet de recherche dans ce domaine.

## CONCLUSIONS

Cette étude bibliographique s'est attachée à montrer quels étaient les paramètres biologiques susceptibles d'être utilisés comme marqueurs fiables et pratiques de l'inflammation chez les bovins.

L'intérêt des données hématologiques semble limité, en raison de leur faible sensibilité. En outre, leurs variations physiologiques sont importantes ce rend leur interprétation parfois délicate. Leur exploration requiert, de plus, des compétences particulières.

L'apport des modifications biochimiques et cytologiques locales liées à l'inflammation est indéniable, que ce soit dans le LCR, le liquide péritonéal ou le lait. Certains aspects analytiques sont contraignants. De plus l'obtention d'un échantillon de LCR ou de liquide péritonéal peu ou pas contaminé par du sang est parfois délicate. De même, la nécessité, pour une analyse précise, de travailler à partir de prélèvements récents, comme par exemple la cytologie du LCR rend difficile l'application en clinique bovine pratique. Il n'en demeure pas moins qu'en l'absence d'autres marqueurs, l'exploration de ces paramètres est conseillée.

L'étude des protéines de la phase aiguë a permis de montrer que leur exploration en médecine bovine semblait prometteuse. En particulier, l'évaluation combinée de la SAA et de l'haptoglobine s'avère particulièrement intéressante compte tenu de leur sensibilité et leur spécificité respective vis à vis de la réaction inflammatoire. Même si sa sensibilité est moyenne, le fibrinogène reste encore aujourd'hui un marqueur de choix principalement en raison de son dosage simple, rapide et peu coûteux. Les analyses peuvent s'effectuer à partir de sérums ou de plasma congelés, permettant de s'affranchir de la contrainte temps ; les mesures sont objectives et quantitatives, permettant l'établissement de valeurs pronostiques.

Cependant l'application clinique du dosage des protéines de la phase aiguë nécessite des connaissances plus approfondies de leur physiopathologie. Comment expliquer et s'affranchir des différences marquées existant entre les modèles expérimentaux et les études de terrains? Des recherches sur la régulation de la synthèse de ces protéines sont d'une importance majeure pour la compréhension des mécanismes qui soutendent leurs variations. La réalisation d'études précises portant sur les cinétiques et les performances des différents marqueur, lors d'affection aiguës ou chronique, permettrait des avancées considérables. De

plus la standardisation des méthodes d'analyses est une démarche nécessaire pour permettre de comparer les résultats obtenus entre différents laboratoires.

Des applications autres que cliniques voient le jour, en particulier dans le domaine de l'hygiène alimentaire et de zootechnie. Grâce au développement de techniques de dosage rapides et à terme peu onéreuses, l'évaluation des protéines de la phase aiguë pourra ce faire au sein même de la chaîne d'abattage et permettrait de détecter les animaux malades. Utilisées à l'échelle du troupeau, les protéines de la phase aiguë pourraient servir de marqueurs de pathologies subcliniques entraînant des baisses de performances zootechniques.



## REFERENCES

1. **Aldridge, B.M., Gary, F.B., and Adams, R.**  
Neonatal septicemia in calves : 25 cases (1985-1990).  
Journal of the American Veterinary Medical Association, 1993, **203**(9), 1324-1329.
2. **Alsemgeest, S.P., Horadagoda, A., Hulskamp-Koch, C.K., Tooten, P.C., Kim, D.H., Niewold, T.A., and Gruys, E.**  
First evidence for the existence of multiple isoforms of bovine serum amyloid-A (apoSAA).  
Scandinavian Journal of Immunology, 1995, **41**(4), 407-13.
3. **Alsemgeest, S.P.M., Jonker, F.H., Taverne, M.A.M., Kalsbeek, H.C., Wensing, T., and Gruys, E.**  
Serum amyloid A (SAA) and haptoglobin (HP) plasma concentration in newborn calves.  
Theriogenology, 1995, **43**, 381-387.
4. **Alsemgeest, S.P.M., Kalsbeek, H.C., Wensing, T., Koeman, J.P., Van Ederen, A.M., and Gruys, E.**  
Concentration of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (Hp) as parameters of inflammatory diseases in cattle.  
The Veterinary Quarterly, 1994, **16**(1), 21-23.
5. **Alsemgeest, S.P.M., Taverne, M.A.M., Boosman, R., Van Der Weyden, B.C., and Gruys, E.**  
Peripartum acute-phase serum amyloid-A concentration in plasma of cows and fetuses.  
American Journal of Veterinary Research, 1993, **54**(1), 164-167.
6. **Alsemgeest, S.P.M., Van T Klooster, G.A.E., Van Miert, A.S.J.P.A.M., Hulskamps-Koch, C.K., and Gruys, E.**  
Primary bovine hepatocytes in the study of cytokine induced acute-phase protein secretion in vitro.  
Veterinary Immunology and Immunopathology, 1996, **53**, 179-184.
7. **Alvarez, A., Humblet, M.F., Trzpiot, L., and Godeau, J.M.**  
Capillary Zone Electrophoresis procedure for bovine haptoglobin determination by measuring the haemoglobin binding capacity : precision and sensitivity in respect of capillary and canine haemoglobin characteristics.  
*in* *Proceeding Second European Colloquium on Animal Acute Phase Proteins*. Bonn, Deutschland 23-25 mai 2001
8. **Alzuherri, H.M., Woodall, C.J., and Clarke, C.J.**  
Increased intestinal TNF-alpha, IL-1 beta and IL-6 expression in ovine paratuberculosis.  
Veterinary Immunology and Immunopathology, 1996, **49**(4), 331-345.
9. **Anderson, D.E., Cornwell, D., Anderson, L.S., St. Jean, G., and Desrochers, A.**  
Comparative analysis of peritoneal fluid from calves and adult cattle.  
American Journal of Veterinary Research, 1995, **56**(8), 973-976.

10. **Anderson, D.E., Cornwell, D., St. Jean, G., Desrochers, A., and Anderson, L.S.**  
Comparison of peritoneal fluid analysis before and after exploratory celiotomy and omentopexy in cattle.  
American Journal of Veterinary Research, 1994, **55**(12), 1633-1637.
11. **Asai, T., Mori, M., Okada, M., Uruno, K., Yazawa, S., and Shibata, I.**  
Elevated serum haptoglobin in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus.  
Veterinary Immunology and Immunopathology, 1999, **70**(1-2), 143-148.
12. **Banks, R.E., Forbes, M.A., Storr, M., Higginson, J., Thompson, D., Raynes, J., Illingworth, J.M., Perren, T.J., Selby, P.J., and Whicher, J.T.**  
The acute phase protein response in patients receiving subcutaneous IL-6.  
Clinical Experimental Immunology, 1995, **102**(1), 217-223.
13. **Barkema, H.W., Deluyker, H.A., Schukken, Y.H., and Lam, T.J.G.M.**  
Quarter-milk somatic cell count at calving and at the first six milkings after calving.  
Preventive Veterinary Medicine, 1999, **38**, 1-9.
14. **Baumann, H. and Gauldie, J.**  
The acute phase response.  
Immunology Today, 1994, **15**(2), 74-80.
15. **Baumann, H. and Schendel, P.**  
Interleukine-11 regulates the hepatic expression of the same plasma protein genes as interleukin-6.  
Journal of Biological Chemistry, 1991, **266**(30), 20424-20427.
16. **Bennett, B.W., Kerschen, R.P., and Nockels, C.F.**  
Stress induced hematological changes in feedlots cattle.  
Agri Practice, 1989, **10**(1), 16-28.
17. **Bézille, P.**  
Numération et formule leucocytaire chez les bovins.  
Point Vétérinaire, 1993, **25**(154), 285-287.
18. **Biggadike, H.J., Ohnstad, I., Laven, R.A., and Hillerton, J.E.**  
Evaluation of measurements of the conductivity of quarter milk samples for the early diagnosis of mastitis.  
Veterinary Record, 2002, **150**, 655-658.
19. **Billon, P., Menard, J.L., Berry, F., and Gaudin, V.**  
La détection des mammites par la mesure de la conductivité électrique du lait.  
Bulletin des GTV, 2001, (12), 35-39.
20. **Biran, H., Friedman, N., Neumann, L., Pras, M., and Shainkin-Kestenbaum**  
Serum amyloid A (SAA) variations in patients with cancer : correlation with disease activity, stage, primary site, and prognosis.  
Journal of Clinical Pathology, 1986, **39**(7), 794-797.

21. **Blackburn, W.D.**  
Validity of acute phase proteins as makers of disease activity.  
The Journal of Rheumatology, 1994, **21**(10 (supp 42)), 9-13.
22. **Blaisdell, F.S. and Dodds, W.J.**  
Evaluation of two microhematocrit methods for quantitating plasma fibrinogen.  
Journal of the American Veterinary Medical Association, 1977, **171**(4), 340-342.
23. **Bodoh, G.W., Battista, W.J., Schultze, L.H., and Johnston, J.K.**  
Variation in somatic cell counts in dairy herd improvement milk samples.  
Journal of Dairy Science, 1976, **59**, 1119-1123.
24. **Boosman, R., Niewold, T.A., and Gruys, E.**  
Serum amyloid A concentration in cows given endotoxin as an acute phase stimulant.  
American Journal of Veterinary Research, 1989, **50**(10), 1690-1694.
25. **Bottiger, L.E.**  
Erythrocyte sedimentation rate and protein-bound carbohydrates in domestic animals.  
Acta Vet Scand, 1967, **8**(3), 279-86.
26. **Braun, U., Stehle, C., and Ehrensperger**  
Clinical findings and treatment of listeriosis in 67 sheep and goats.  
Veterinary Record, 2002, **150**, 38-42.
27. **Buelow, K.L., Thomas, C.B., Goodger, W.J., Nordlund, K.V., and Collins, M.T.**  
Effect of milk samples collection strategy on the sensitivity and specificity of bacteriologic culture and somatic cell count for detection of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in dairy cattle.  
Preventive Veterinary Medicine, 1996, **26**, 1-8.
28. **Bureau, F., Dellhalle, S., Bonizzi, G., Fiévez, L., Dogné, S., Kirschvink, N., Vanderplasschen, A., Merville, M.A., Bours, V., and Lekeux, P.**  
Mechanisms of persistent NK-Kappa B activity in the bronchi of an animal model of asthma.  
Journal of Immunology, 2000, **165**, 5822-5830.
29. **Campbell, M.D., Bellamy, J.E.C., and Seargy, G.P.**  
Determination of plasma fibrinogen concentration in horses.  
American Journal of Veterinary Research, 1981, **42**(1), 100-104.
30. **Castell, J.V., Gomez-Lechon, M.J., David, M., Andus, T., Geiger, T., Trullenque, R., Fabra, R., and Heinrich, P.C.**  
Interleukine-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hépatocytes.  
FEBS letters, 1989, **242**(2), 237-239.
31. **Cebra, M.L., Cebra, C.K., Gary, F.B., and Gould, D.H.**  
Idiopathic eosinophilic enteritis in four cattle.  
Journal of the American Veterinary Medical Association, 1998, **212**(2), 258-261.

32. **Cerone, S.I., Sansinanea, A.S., Streitenberger, S.A., Garcia, M.C., and Auza, N.J.**  
Cytochrome c oxidase, Cu,Zn-superoxide dismutase, and ceruloplasmin activities in copper-deficient bovines.  
*Biol Trace Elem Res*, 2000, **73**(3), 269-78.
33. **Chambers, R.E., Stross, P., Barry, R.E., and Whicher, J.T.**  
Serum amyloid A protein compared with C-reactive protein, alpha 1-antichymotripsin and alpha 1-acid glycoprotein as a monitor of inflammatory bowel disease.  
*European Journal of Clinical Investigation*, 1987, **17**(5), 460-467.
34. **Chamoun, V., Zeman, A., Blennow, K., Fredman, P., Wallin, A., Keir, G., Giovannoni, G., and Thompson, E.J.**  
Haptoglobins as markers of blood-CSF barrier dysfunction : the findings in normal CSF.  
*Journal of Neurological Science*, 2001, **182**(2), 117-121.
35. **Cheryk, L., Hooper-McGrevy, E., and Gentry, P.A.**  
Alterations in bovine platelet function and acute phase proteins induced by *Pasteurella haemolytica* A1.  
*Canadian Journal of Veterinary Research*, 1996, **62**, 1-8.
36. **Clavin, J., Neale, G., Fotherby, K.J., and Price, C.P.**  
The relative merits of acute phase proteins in the recognition of inflammatory conditions.  
*Annals of Clinical Biochemistry*, 1988, **25**, 60-66.
37. **Cole, D.J., Roussel, A.J., and Whitney, M.S.**  
Interpreting a bovine CBC : collecting a sample and evaluating the erythron.  
*Veterinary Medicine*, 1997, **92**, 460-468.
38. **Cole, D.J., Roussel, A.J., and Whitney, M.S.**  
Interpreting a bovine CBC : evaluating the leukon and acute-phase proteins.  
*Veterinary Medicine*, 1997, **92**, 470-478.
39. **Cole, N.A., Camp, T.H., Rowe, L.D., Stevens, D.G., and Hutcheson, D.P.**  
Effect of transport on feeder calves.  
*American Journal of Veterinary Research*, 1988, **49**(2), 178-183.
40. **Conner, J.G., Eckersall, P.D., Doherty, M., and Douglas, T.A.**  
Acute phase response and mastitis in the cow.  
*Research in Veterinary Science*, 1986, **41**, 126-128.
41. **Conner, J.G., Eckersall, P.D., Wiseman, A., Aitchison, T.C., and Douglas, T.A.**  
Bovine acute phase response following turpentine injection.  
*Research in Veterinary Science*, 1988, **44**, 82-88.
42. **Conner, J.G., Eckersall, P.D., Wiseman, A., Bain, R.K., and Douglas, T.A.**  
Acute phase response in calves following infection with *Pasteurella haemolytica*, *Ostertagia ostertagi* and endotoxin administration.  
*Research in Veterinary Science*, 1989, **47**, 203-207.

43. **Constable, P.D., Meier, W.A., Foley, G.L., Morin, D., Cutlip, R.C., and Zachary, J.F.**  
Visna-like disease in a ram with chronic demyelinating encephalomyelitis.  
Journal of the American Veterinary Medical Association, 1996, **208**(1), 117-120.
44. **Constable, P.D., St. Jean, G., Hull, B.L., Rings, D.M., Morin, D.E., and Nelson, D.R.**  
Intussusception in cattle : 336 cases (1964-1993).  
Journal of the American Veterinary Medical Association, 1997, **210**(3), 531-536.
45. **Cullor, J.S., Smith, W., Zinkl, J.G., Dellinger, J.D., and Boone, T.**  
Hematologic and bone marrow changes after short and long term administration of two recombinant bovine Granulocyte Colony-stimulating Factors.  
Veterinary Pathology, 1992, **29**, 521-527.
46. **Dall'Ava, J. and Polla, B.S.**  
Les signaux initiateurs et évolutifs de la réponse inflammatoire.  
*in* Russo-Marie, F., Peltier, A., Polla, B.S. L'inflammation. Paris: John Libbey, 1996. p 133-141.
47. **Dayley, M.J., Oldham, E.R., Williams, T.J., and Coyle, P.A.**  
Quantitative and qualitative properties of host polymorphonuclear cells during experimentally induced Staphylococcus aureus mastitis in cows.  
American Journal of Veterinary Research, 1991, **52**, 474-479.
48. **Defilippi, P., Poupart, P., Tavernier, J., Fiers, W., and Content, J.**  
Induction and regulation of mRNA encoding 26-kDa protein in human cell lines treated with recombinant human tumor necrosis factor.  
Proceeding of the National Academy of Science, 1987, **84**, 7251-7255.
49. **Deignan, T., Alwan, A., Kelly, J., McNair, J., Warren, T., and O'Farrelly, C.**  
Serum haptoglobin : an objective indicator of experimentally induced Salmonella infection in calves.  
Research in Veterinary Science, 2000, **69**, 153-158.
50. **DeLahunta, A.**  
Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology, Second Edition. Philadelphia: WB Saunders, 1983. 471 p.
51. **Delbar, A., Naylor, J.M., and Bloom, J.C.**  
Effects of Escherichia coli endotoxin on leucocytes and platelets counts, fibrinogen concentrations, and blood clotting in colostrum-fed and colostrum-deficient neonatal calves.  
American Journal of Veterinary Research, 1984, **45**(4), 670-677.
52. **Depelchin, B.O., Bloden, S., Hooremans, M., Noirfalise, A., and Ansay, M.**  
Clinical and experimental modifications of plasma iron and zinc concentrations in cattle.  
Veterinary Record, 1985, **116**, 519-521.

53. **Derfalvi, B., Igaz, P., Fulop, K.A., Szalai, C., and Falus, A.**  
Interleukin-6-induced production of type II acute phase proteins and expression of junB gene are downregulated by human recombinant growth hormone in vitro.  
Cellular Biology International, 2000, **24**(2), 109-114.
54. **Doherty, M.L., Bassett, H.F., Breathnach, R., Monaghan, M.L., and McErlean, B.A.**  
Outbreak of acute coenuriasis in adult sheep in Ireland.  
Veterinary Record, 1989, **125**, 185.
55. **Dohoo, I.R.**  
An evaluation of the validity of individual cow somatic cell counts from cows in early lactation.  
Preventive Veterinary Medicine, 1993, **16**, 103-110.
56. **Dohoo, I.R. and Leslie, K.E.**  
Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections.  
Preventive Veterinary Medicine, 1991, **10**, 225-232.
57. **Dohoo, I.R. and Meek, A.H.**  
Somatic Cell Counts in bovine milk.  
Canadian Veterinary Journal, 1982, **23**, 119-125.
58. **Dubensky, R.A. and White, M.E.**  
The sensitivity, specificity and predictive value of the total plasma protein in the diagnosis of traumatic reticuloperitonitis.  
Canadian Journal of Comparative Medicine, 1983, **47**, 241-244.
59. **Ebeid, M. and Rings, D.M.**  
Generalized peritonitis in cattle : 31 cases (1993-1997).  
The Bovine Practitioner, 1999, **33**(2), 144-148.
60. **Eckersall, P.D.**  
Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals.  
Revue de Médecine Vétérinaire, 2000, **151**(7), 577-584.
61. **Eckersall, P.D., Bennett, D., McComb, C., Weber, A., and McDonald, T.L.**  
The acute phase protein response in dogs with arthritis.  
*in* *Proceeding IVth European Comparative Clinical Pathology Meeting. (Résumé)*. Verona, Italy
62. **Eckersall, P.D. and Conner, J.G.**  
Bovine and canine acute phase proteins.  
Veterinary Research Communications, 1988, **12**, 169-178.
63. **Eckersall, P.D. and Conner, J.G.**  
Plasma haptoglobin in cattle (*Bos taurus*) exists as polymers in association with albumin.  
Comparative Biochemistry and Physiology, 1990, **44**, 309-314.

64. **Eckersall, P.D., Duthie, S., Safi, S., Moffatt, D., Horadogoda, N.U., Doyle, S., Bennett, D., and Fitzpatrick, J.L.**  
An automated biochemical assay for haptoglobin : prevention of interference from albumin.  
*Comparative Haematology International*, 1999, **9**, 117-124.
65. **Eckersall, P.D., Duthie, S., Toussaint, M.J.M., Gruys, E., Heegaard, P., ALAVA, M., Lipperheide, C., and Madec, F.**  
Standardisation of diagnostic assays for animal acute phase proteins.  
*Advances in Veterinary Medicine*, 1999, **41**, 643-655.
66. **Eckersall, P.D., Parton, H., Conner, J.G., Nash, A.S., Watson, T., and Douglas, T.A.**  
Acute phase reactants in diseases of dog and cattle.  
1988.
67. **Eckersall, P.D., Safi, S., Weber, A., McDonald, T.L., Young, F., Fitz-Patrick, J.L., Logue, D., Knight, C., and Nolan, A.**  
The acute phase protein response of haptoglobin, serum amyloid A and alpha 1 acid glycoprotein in dairy cows with mastitis.  
*in Proceeding of the IVth European Comparative Clinical Pathology Meeting*. Verona, Italy (Résumé)
68. **Eckersall, P.D., Saini, P.K., and McComb, C.**  
The acute phase response of acid soluble glycoprotéine, alpha-1-acid glycoprotein, céruloplasmine, haptoglobin and C-reactive protein, in the pig.  
*Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1996, **51**, 377-385.
69. **Eckersall, P.D., Young, F.J., McComb, C., Hogarth, C.J., Safi, S., Weber, A., McDonald, T., Nolan, A.M., and Fitzpatrick, J.L.**  
Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis.  
*Veterinary Record*, 2001, **148**, 35-41.
70. **Ek, N.**  
The quantitative determination of fibrinogen in normal bovine plasma and in cows with inflammatory conditions.  
*Acta veterinaria Scandinavica*, 1972, **13**, 175-184.
71. **Ellis, J. and DeMartini, J.C.**  
Retroviral disease in small ruminants, Ovine progressive pneumonia and Caprine arthritis-encephalitis.  
*Compendium of Continuing Education*, 1983, **5**(4), S173-S183.
72. **Elson, E.C.**  
Quantitative determination of serum haptoglobin.  
*American Journal of Clinical Pathology*, 1974, **62**, 655-673.
73. **Emanuelson, U. and Wever, P.**  
Potential of differential somatic cells counts as indicators of mastitis in quarter milk samples from dairy cows.  
*Acta veterinaria Scandinavica*, 1989, **30**, 475-481.

74. **Engler, R.**  
Protéines de la phase aiguë de l'inflammation : Acute phase proteins.  
Compte Rendu de la Société de Biologie, 1995, **189**, 563-578.
75. **Erskiner, R.J. and Bartlett, P.C.**  
Serum concentration of Copper, Iron and Zinc during *Escherichia coli*-induced mastitis.  
Journal of Dairy Science, 1993, **76**(2), 408-413.
76. **Ferrouillet, C., Fecteau, G., Higgins, R., and Lanevski, A.**  
Analyse du liquide céphalo-rachidien pour le diagnostic des atteintes du système nerveux des bovins.  
Point Vétérinaire, 1998, **29**(194), 783-788.
77. **Ferrouillet, C., Fecteau, G., and Lanevski, A.**  
Prélèvement et analyse du liquide céphalo-rachidien chez les bovins.  
Point Vétérinaire, 1998, **29**(194), 777-782.
78. **Fournier, T., Medjoubi, N., and Porquet, D.**  
Alpha-1-acid glycoprotein.  
Biochimica et Biophysica Acta, 2000, **1482**, 157-171.
79. **Fürll, M., Müller, D., Wilken, H., Gruys, E., and Krüger, M.**  
Haptoglobin and CRP in healthy cows with varying milk yield during early lactation.  
*in* *Proceeding Second European Colloquium on Animal Acute Phase Proteins*. Bonn, Deutschland 23-25 mai 2001
80. **Furr, M.O. and Tyler, R.D.**  
Cerebrospinal fluid creatine kinase activity in horses with central nervous system disease : 69 cases (1984-1989).  
Journal of the American Veterinary Medical Association, 1990, **197**(2), 245-248.
81. **Gabay, C. and Kushner, I.**  
Acute-phase proteins and other systemic response to inflammation.  
New England Journal of Medicine, 1999, **340**, 448-454.
82. **Gentry, P.A., Liptrap, R.M., Tremblay, R.R.M., Lichen, L., and Ross, M.L.**  
Adrenocorticotrophic hormone fails to alter plasma fibrinogen and fibronectin values in calves but not in rabbits.  
Veterinary Research Communications, 1992, **16**, 253-264.
83. **George, J.W. and O'Neill, S.L.**  
Comparison of refractometer and biuret methods for total protein measurement in body cavity fluids.  
Veterinary Clinical Pathology, 2001, **30**(1), 16-18.
84. **George, L.W.**  
Disease of the nervous system : cerebrospinal fluid.  
*in* Smith, B.P. Large Animal Internal Medicine, Second Edition. St Louis, Missouri: C.V. Mosby, 1996. p 1001-1004.

85. **Glass, E.J.**  
Acute phase protein response to tropical theileriosis in cattle.  
*in* *Proceeding of the first European Colloquium on Animal Acute Phase Proteins*. Glasgow, United Kingdom 7 avril 2000
86. **Glass, E.J.**  
Sérum amyloid A responses to tropical Theileriosis in cattle.  
*in* *Proceeding of the Second European Colloquium on Animal Acute Phase Proteins*. Bonn, Deutschland 23-25 mai 2001
87. **Godenir, N.L., Jeenah, M.S., Coetzee, G.A., Van Der Westhuyzen, D.R., Strachan, A.F., and De Beer, P.**  
Standardisation of the quantitation of serum amyloid A protein (SAA) in human serum.  
*Journal of Immunological Methods*, 1985, **83**, 217-225.
88. **Godson, D.L., Baca-Estrada, M.E., Andrew, G., and Van Kessel, G.**  
Regulation of bovine acute phase response by recombinant Interleukine-1 $\beta$ .  
*Canadian Journal of Veterinary Research*, 1995, **59**, 249-255.
89. **Godson, D.L., Campos, M., Attah-Poku, S.K., Redmond, M.J., and Cordeiro, D.M.**  
Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease.  
*Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1996, **51**, 277-292.
90. **Green, S.L. and Smith, L.L.**  
Meningitis in neonatal calves : 32 cases (1983-1990).  
*Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1992, **201**(1), 125-128.
91. **Grönlund, U., Hulten, C., and Waller, K.P.**  
Serum concentrations of Serum Amyloid A and Haptoglobin during acute and chronic mastitis, experimentally induced by *Staphylococcus aureus*.  
*in* *Proceeding of the Second European Colloquium on Animal Acute Phase Proteins*. Bonn, Deutschland 23-25 mai 2001
92. **Gruys, E., Obwolo, M.J., and Toussaint, M.J.M.**  
Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry : a review.  
*Veterinary Bulletin*, 1994, **64**(11), 1009-1018.
93. **Gruys, E., Van Ederen, A.M., Alsemgeest, S.P.M., Kalsbeek, H.C., and Wensing, T.**  
Acute phase protein values in blood of cattle as indicators of animals with pathological processes.  
*Archiv für Lebensmittelhygiene*, 1993, **44**, 105-128.
94. **Guillen, M.I., Gomez-Lechon, M.J., Nakamura, T., and Castell, J.V.**  
The hepatocytes growth factor regulates the synthesis of acute-phase proteins in human hepatocytes : divergent effect on interleukine-6-stimulated genes.  
*Hepatology*, 1996, **23**(6), 1345-1352.

95. **Guillou, F.**  
Etude cinétique des concentrations sériques d'haptoglobine et de céruloplasmine lors de réaction inflammatoires chez les bovins.  
Th.: Med. vet.: lyon: 1988-Lyon 117, 53 p.
96. **Hachulla, E.**  
Protéines de la phase aiguë.  
*in* Russo-Marie, F., Peltier, A., Polla, B.S. L'inflammation. Paris: John Libbey, 1996. p 468-479.
97. **Haeffner-Cavaillon, N. and Cavaillon, J.M.**  
Cytokines et inflammation.  
*in* Cavaillon, J.M. Les cytokines. Paris: Masson, 1996. p 501-522.
98. **Hanson, R.R., Nixon, A.J., Gronwall, R., Meyer, D., and Pendergast, J.**  
Evaluation of peritoneal fluid following intestinal resection and anastomosis in horses.  
American Journal of Veterinary Research, 1992, **53**(2), 216-221.
99. **Harmon, R.J.**  
Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts.  
Journal of Dairy Science, 1994, **77**, 2103-2112.
100. **Hartmann, A., Eide, T.C., Fauchald, P., Bental, O., Herbert, J., Gallimore, J.R., and Pepys, M.B.**  
Serum amyloid A protein is a clinically useful indicator of acute renal allograft rejection.  
Nephrology Dialysis Transplantation, 1997, **12**, 161-166.
101. **Hayashi, S., Jinbo, T., Iguchi, K., Shimizu, M., Shimada, T., Nomura, M., Ishida, Y., and Yamamoto, S.**  
A comparison of the concentration of C-reactive Protein and alpha-1- Acid Glycoprotein in the serum of young and adult dogs with acute inflammation.  
Veterinary Research Communications, 2001, **25**(2), 117-126.
102. **Heegaard, P., Godson, D.L., Toussaint, M.J.M., Tjernehoj, K., Larsen, L.E., Viuff, B., and Ronsholt, L.**  
The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus.  
Veterinary Immunology and Immunopathology, 2000, **77**, 151-159.
103. **Heegaard, P.M., Klausen, J., Nielsen, J.P., Gonzalez-Ramon, N., Pineiro, M., Lampreave, F., and Alava, M.A.**  
The porcine acute phase response to infection with Actinobacillus pleuropneumoniae. Haptoglobin, C-reactive protein, major acute phase protein and serum amyloid A protein are sensitive indicators of infection.  
Comparative Biochemistry and Physiology. B, 1998, **119**(2), 365-373.
104. **Heinrich, P.C.**  
Cytokine control of the acute phase response.  
*in* *Proceeding of the Second European Colloquium of Animal Acute Phase Proteins.* Bonn, Deutschland 23-25 mai 2001

105. **Heinrich, P.C., Castell, J.C., and Andust, T.**  
Interleukine-6 and the acute phase response.  
Biochemistry Journal, 1990, **265**, 621-636.
106. **Higushi, H., Katoh, N., Miyamoto, T., and Uchida, E.**  
Dexamethasone-induced haptoglobin release by calf liver parenchymal cells.  
American Journal of Veterinary Research, 1994, **55**(8), 1080-1085.
107. **Hinchcliff, K.W.**  
Cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of neurological disease in large animals.  
British Veterinary Journal, 1995, **151**(6), 599-602.
108. **Hirsch, V.M. and Twonsend, H.G.G.**  
Peritoneal fluid analysis in the diagnosis of abdominal disorders in cattle : a retrospective study.  
Canadian Veterinary Journal, 1982, **23**, 348-354.
109. **Hirvonen, J., Eklund, K., Huszenicza, G., Kulcsar, M., Saloniemi, H., and Pyörälä, S.**  
Acute phase response in dairy cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis.  
Acta veterinaria Scandinavica, 1999a, **40**, 35-46.
110. **Hirvonen, J., Huszenicza, G., K, M., and Pyörälä, S.**  
Acute-phase response in dairy cows with acute post-partum metritis.  
Theriogenology, 1999b, **51**, 1071-1083.
111. **Hirvonen, J. and Pyörälä, S.**  
Acute-phase response in dairy cows with surgically-treated abdominal disorders.  
The Veterinary Journal, 1998, **155**, 53-61.
112. **Hirvonen, J., Pyörälä, S., and Jousimies-Somer, H.**  
Acute phase response in heifers with experimentally induced mastitis.  
Journal of Dairy Research, 1996, **63**, 351-360.
113. **Hoare, R.J.T., Sheldrake, P.J.N., McGregor, G.D., and Woodhouse, E.W.**  
Somatic cell volume distribution as an aid to the diagnosis of mastitis.  
Journal of Dairy Research, 1980, **47**, 167-176.
114. **Höfner, M.C., Fosbery, M.W., Eckersall, P.D., and Donaldson, A.I.**  
Haptoglobin response of cattle infected with foot-and-mouth disease virus.  
Research in Veterinary Science, 1994, **57**, 125-128.
115. **Honkanen-Buzalski, T., Katila, T., and Sandholm, M.**  
Milk antitrypsin activity during clinical and experimental bovine mastitis.  
Acta veterinaria Scandinavica, 1981, **22**, 360-368.
116. **Honkanen-Buzalski, T. and Sandholm, M.**  
Trypsin-inhibitors in mastitic milk and colostrum : correlation between trypsin-inhibitor capacity, bovine serum albumin and somatic cell counts.

Journal of Dairy Research, 1981, **48**, 213-223.

117. **Horadagoda, A., Eckersall, P.D., Alsemgeest, S.P.M., and Gibbs, H.A.**

Purification and quantitative measurement of bovine serum amyloid A.

Research in Veterinary Science, 1993, **55**, 317-325.

118. **Horadagoda, A., Eckersall, P.D., Hodgson, J.C., Gibbs, H.A., and Moon, G.M.**

Immediate responses in TNF $\alpha$  and acute phase protein concentrations to infection with *Pasteurella haemolytica* A1 in calves.

Research in Veterinary Science, 1994, **57**, 129-132.

119. **Horadagoda, N.U., Knox, K.M.G., Gibbs, H.A., Reid, S.W.J., Horadogoda, A., Edwards, S.E.R., and Eckersall, P.D.**

Acute phase proteins in cattle : discrimination between acute and chronic inflammation.

Veterinary Record, 1999, **144**, 437-441.

120. **Hulten, C., Tulamo, R.M., Suominen, M.M., Burvall, K., Marhaug, G., and Forsberg, S.E.R.**

A non-competitive chemiluminescence enzyme immunoassay for the equine acute phase protein serum amyloid A (SAA) - a clinically useful inflammatory marker in the horse.

Veterinary Immunology and Immunopathology, 1999, **68**, 267-281.

121. **Husebekk, A., Husby, G., Sletten, K., Skogen, B., and Nordstoga, K.**

Characterization of bovine amyloid proteins SAA and AA.

Scandinavian Journal of Immunology, 1988, **27**(6), 739-43.

122. **Itoh, H., Tamura, K., Motoi, Y., Takase, K., and Nakamura, T.**

Serum  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein in cattle with inflammatory disease and that after operation.

Japanese Journal of Veterinary Science, 1990, **52**(6), 1293-1296.

123. **Iwata, H., Ono, K., Hasegawa, A., and Tomoda, I.**

Isolation of bovine serum  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein.

Japanese Journal of Veterinary Science, 1987, **49**(2), 383-386.

124. **Iwata, H., Ono, K., Hasegawa, A., and Tomoda, I.**

Serum  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein levels in cows.

Japanese Journal of Veterinary Science, 1988, **50**(5), 1119-1120.

125. **Jacobs, R.M., Cochrane, S.M., Lumsden, J.H., and Norris, A.L.**

Relationship of cerebrospinal fluid protein concentration determined by dye-binding and urinary dipstick methodologies.

Canadian Veterinary Journal, 1990, **31**, 587-588.

126. **Jain, N.C.**

Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993. 417 p.

127. **Jain, N.C., Schalm, O.W., and Lasmanis, J.**

Neutrophil kinetics in endotoxin-induced mastitis.

American Journal of Veterinary Research, 1978, **39**(10), 1662-1667.

128. **Jamison, J.L. and Prescott, J.F.**  
Bacterial meningitis in large animals-Part 1.  
Compendium of Continuing Education, 1987, **9**, F399-F406.
129. **Jensen, A.L.**  
Alternative ways of evaluating test results.  
Revue de Médecine Vétérinaire, 2000, **151**(7), 593-599.
130. **Jensen, L.E. and Whitehead, A.A.**  
Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute phase response.  
Biochemistry Journal, 1998, **334**, 489-503.
131. **Johnson, C.G., Fales, W.H., Maddox, C.W., and Ramos-Vara, J.A.**  
Evaluation of laboratory tests for confirming the diagnosis of encephalitic listeriosis in ruminants.  
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1995, **7**(2), 223-228.
132. **Johnston, J.K. and Morris, D.D.**  
Alterations in blood proteins.  
*in* Smith, B.P. Large Animal Internal Medicine, Second Edition. St Louis, Missouri: Mosby, 1996. p 489-499.
133. **Jones, G.E. and Mould, D.L.**  
Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobins to a microtitration plate system.  
Research in Veterinary Science, 1984, **37**, 87-92.
134. **Kajikawa, T., Furata, A., Onishi, T., Tajima, T., and Sugii, S.**  
Changes in concentrations of serum amyloid A protein, Alpha 1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery.  
Veterinary Immunology and Immunopathology, 1999, **29**(68(1)), 91-98.
135. **Kaneko, J.J.**  
Chapter 5 : serum proteins and the dysproteinemias.  
*in* Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. Clinical Biochemistry of domestic animals, fifth edition. San diego: Academic Press, 1997. p 117-138.
136. **Kanno, H. and Katoh, N.**  
Analysis by enzy-linked immunosorbent assay and Two dimensional electrophoresis of haptoglobin in the high density lipoprotein fraction in cows.  
Journal of veterinary Medical Science, 2001, **63**(61-66).
137. **Karreman, H.J., Wentink, G.H., and Wensing, T.**  
Using serum amyloid A to screen dairy cows for sub-clinical inflammation.  
The Veterinary Quarterly, 2000, **22**(3), 175-178.
138. **Katnik, I. and Dobryczycka, W.**  
Enzyme immunoassay to measure low levels of haptoglobin in biological fluids.  
Journal of Immunoassay, 1990, **11**(4), 503-517.

139. **Katnik, I., Pupek, M., and Stefaniak, Y.**  
Cross reactivities among some mammalian haptoglobins studied by a monoclonal antibody.  
*Comparative Biochemistry and Physiology. B*, 1998, **119**(2), 335-340.
140. **Katoh, N. and Akagawa, H.**  
Detection of haptoglobin in the High-Density Lipoprotein and the Very High-Density Lipoprotein fractions from sera of calves with experimental pneumonia and cows with naturally occurring fatty liver.  
*Journal of Veterinary Medical Science*, 1999, **61**(2), 119-124.
141. **Kelly, A.L., Tiernan, D., O'Sullivan, C., and Joyce, P.**  
Correlation between bovine milk somatic cell count and polymorphonuclear leucocyte levels for samples of bulk milk and milk from individual cows.  
*Journal of Dairy Science*, 2000, **83**, 300-304.
142. **Kent, J.**  
Acute phase proteins : their use in veterinary diagnosis.  
*British Veterinary Journal*, 1992, **148**(4), 279-282.
143. **Kimura, M., Tomita, Y., Imai, T., Saito, T., Katagiri, A., Matsudo, T., and Takahashi, K.**  
Significance of serum amyloid A on the prognosis in patients with renal cell carcinoma.  
*Cancer*, 2001, **92**(8), 2072-2075.
144. **Knight, A.P. and Jokinen, M.P.**  
Caprine arthritis-encephalitis.  
*Compendium of Continuing Education*, 1982, **4**(6), S263-S270.
145. **Koets, A.P., De Schwartz, N., Tooten, P., Kankoker, M., Broekhuijzen-Davies, J.M., Rutten, V.P.M.G., Van Leengoed, L.A.M.G., Taverne, M.A.M., and Gruys, E.**  
Release of pro-inflammatory cytokines related to luteolysis and the periparturient acute phase response in prostaglandin-induced parturition in cows.  
*Theriogenology*, 1998, **49**, 797-812.
146. **Kopcha, M. and Schultze, A.E.**  
Peritoneal fluid. Part 1. Pathophysiology and classification of nonneoplastic effusions.  
*Compendium of Continuing Education*, 1991, **13**(3), 519-525.
147. **Kopcha, M. and Schultze, A.E.**  
Peritoneal fluid. Part II. Abdominocentesis in cattle and interpretation of nonneoplastic samples.  
*Compendium of Continuing Education*, 1991, **13**(4), 703-710.
148. **Kushner, I., Mackiewicz, A., Ganapathi, M.K., and Schultz, D.**  
Cytokine interaction in regulation of the acute phase response. *Molecular and Cellular Biology of cytokines*.  
*Progress in Leukocyte Biology*, 1990, **10A**, 517-522.

149. **Lampreave, F., Gonzalez-Ramon, N., Martinez-Ayensa, S., Hernandez, M.A., Lorenzo, H.K., Garcia-Gil, A., and Pineiro, A.**  
Characterization of the acute phase serum protein response in pigs.  
*Electrophoresis*, 1994, **15**(5), 672-6.
150. **Lenstsch, A.B., Shanley, T.P., Sarma, V., and Ward, P.A.**  
In vivo suppression of NF-Kappa B and preservation of I- Kappa B alpha by interleukin-10, and interleukin-13.  
*Journal of Clinical Investigation*, 1997, **100**, 2443-2449.
151. **Liberg, P.**  
Agarose gel electrophoretic fractionation of serum proteins in adult cattle.  
*Acta veterinaria Scandinavica*, 1977, **18**, 355-348.
152. **Lippman, R.**  
Comparative studies on the glucose content of cerebrospinal fluid and blood in healthy sheep with listeriosis.  
*Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin*, 1969, **23**(2), 285-289.
153. **Loyer, P., Ilyin, G., Abdel Razzak, Z., Banchereau, J., Dezier, J.F., Campion, J.P., Guguen-Guillouzo, C., and Guillouzo, A.**  
Interleukin-4 inhibits the production of some acute phase proteins by human hepatocytes in primary culture.  
*FEBS letters*, 1993, **336**(2), 215-220.
154. **Luthman, J., Jacobsson, S.O., and Frank, A.**  
Endotoxin-induced changes in plasma mineral and vitamin levels in calves.  
*Acta veterinaria Scandinavica*, 1991, **32**(3), 403-405.
155. **Mackiewicz, A.**  
Acute Phase Proteins and transformed cells.  
*International Review of Cytology*, 1997, **170**, 225-300.
156. **Mackiewicz, A.**  
Application of acute phase in human diagnosis.  
*in Proceeding of The Second European Colloquium of Animal Acute Phase Proteins*. Bonn
157. **Mackiewicz, A., Speroff, T., Ganapathi, M.K., and Kushner, I.**  
Effects of cytokine combinations on acute phase protein production in two human hepatoma cell lines.  
*Journal of Immunology*, 1991, **146**(9), 3032-3037.
158. **Makarov, S.S.**  
NF-KappaB as a therapeutic target in chronic inflammation : recent advances.  
*Molecular Medicine Today*, 2000, **6**.
159. **Makimura, S. and Suzuki, N.**  
Quantitative determination of bovine serum haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases.  
*Japanese Journal of Veterinary Science*, 1982, **44**, 15-21.

160. **Makimura, S. and Usui, M.**  
Correlation between haptoglobin and sialic acid or mucoprotein in diseased bovine sera.  
Japanese Journal of Veterinary Science, 1990, **52**(6), 1245-1250.
161. **Mattila, T., Saari, S., Vartiala, H., and Sandholm, M.**  
Milk antitrypsin as a marker of bovine mastitis - Correlation with bacteriology.  
Journal of Dairy Science, 1985, **68**, 114-122.
162. **Maudsley, S., Rowe, I.F., De Beer, F.C., Herbert, J., and Feinstein, A.**  
Identification and isolation of two pentraxins from bovine serum.  
Clinical and Experimental Immunology, 1987, **67**, 662-673.
163. **McDonald, T.L., Larson, M.A., Mack, D.R., and Weber, A.**  
Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum.  
Veterinary Immunology and Immunopathology, 2001, **83**, 203-211.
164. **McDonald, T.L., Weber, A., and Smith, J.W.**  
A monoclonal antibody sandwich immunoassay for serum amyloid A (SAA) protein.  
Journal of Immunological Methods, 1991, **144**, 149-155.
165. **McNair, J., Elliot, C.T., and Mackie, D.P.**  
Development of a sensitive and specific time resolved fluorimetric immunoassay for the bovine acute phase protein haptoglobin.  
Journal of Immunological Methods, 1995, **184**, 199-205.
166. **McNair, J., Kennedy, D.G., Bryson, D.G., Reilly, G.A.C., McDowell, S.W.J., and Mackie, D.P.**  
Evaluation of a competitive immunoassay for the detection of bovine haptoglobin.  
Research in Veterinary Science, 1997, **63**, 145-149.
167. **McSherry, B.J., Horney, F.D., and Degroot, J.J.**  
Plasma fibrinogen levels in normal and sick cows.  
Canadian Journal of Comparative Medicine, 1970, **34**, 191-197.
168. **Meyer, D.J. and Harvey, J.W.**  
Chapter 2 : hematopoiesis and evaluation of bone marrow.  
in Meyer, D.J.a.H., J.W. Veterinary Laboratory Medicine : Interpretation and diagnosis, Second edition. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p 23-425.
169. **Meyer, D.J. and Harvey, J.W.**  
Chapter 5 : evaluation of leucocytic disorders.  
in Meyer, D.J.a.H., J.W. Veterinary Laboratory Medicine : Interpretation and diagnosis, Second edition. Philadelphia: W.B Saunders, 1998. p 83-110.
170. **Morgan, H.C.**  
The value of the erythrocyte sedimentation rate in veterinary medicine.  
Vet Med Small Anim Clin, 1966, **61**(5), 463-6.

171. **Morimastu, M., Sakai, H., Yoshimatsu, K., Minowa, O., Yamamoto, S., Yatomi, K., Fuginaga, T., and Naiki, M.**  
Isolation and characterization of C-reactive Protein and Serum Amyloid P component from bovine serum.  
Japanese Journal of Veterinary Science, 1989, **51**(4), 723-732.
172. **Morimastu, M., Sarikaputi, M., Saito, M., Yamamoto, S., and Naiki, M.**  
Bovine haptoglobin : single radial immunodiffusion assay of its polymeric forms and dramatic rise in acute-phase sera.  
Veterinary Immunology and Immunopathology, 1992, **33**, 365-372.
173. **Morimastu, M., Syuto, B., Shimada, M., Fuginaga, T., Yamamoto, S., Saito, M., and Naiki, M.**  
Isolation and characterization of bovine haptoglobin from acute phase sera.  
Journal of Biological Chemistry, 1991, **266**, 11833-11837.
174. **Morimastu**  
Evaluation of bovine serum C réactice protein and serum amyloid P component levels by lactation.  
Journal of Dairy Research, 1991, **58**, 257-261.
175. **Moshage, H.**  
Cytokines and the hepatic acute phase response.  
Journal of Pathology, 1997, **181**, 257-266.
176. **Motoi, Y., Itoh, H., Tamura, K., Miyamoto, T., Oohashi, T., and Nagasawa, S.**  
Correlation of serum concentration of  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein with lymphocytes blastogenesis and development of experimentally induced or naturally acquired hepatic abcesses in cattle.  
American Journal of Veterinary Research, 1992, **53**(4), 574-579.
177. **Murata, H. and Miyamoto, T.**  
Bovine haptoglobin as a possible immunomodulator in the sera of transported calves.  
British Veterinary Journal, 1993, **149**(9), 277-283.
178. **Nagahata, H., Taguchi, K., and Noda, H.**  
Preliminary studies on the acid soluble glycoproteins in serum and their diagnostic values for acute inflammatory diseases in cattle.  
Veterinary Research Communications, 1989, **13**, 257-263.
179. **Nakagawa, H., Yamamoto, O., OIKAWA, S., Higushi, H., and Katoh, N.**  
Detection of serum haptoglobin by enzyme-linked immunosorbent assay in cows with fatty liver.  
Research in Veterinary Science, 1997, **62**, 137-141.
180. **Nakagawa-Tosa, N., Morimastu, M., Kawasaki, M., and Nakatsuji, H.**  
Stimulation of haptoglobin synthesis by Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor, but not by Interleukin-1, in bovine primary cultured hepatocytes.  
Journal of Veterinary Medical Science, 1995, **57**(2), 219-223.

181. **Nakajima, Y., Mikami, O., Yoshioka, M., and Motoi, Y.**  
Elevated levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 activities in the sera and milk of cows with naturally occurring coliform mastitis.  
*Research in Veterinary Science*, 1997, **62**, 297-298.
182. **Nakajima, Y., Momotani, E., Murakimi, T., and Morimastu, M.**  
Induction of acute phase protein by recombinant human interleukin-6 (IL-6) in calves.  
*Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1993, **35**, 385-391.
183. **Nazifi, S., Rezakhani, A., and Badran, M.**  
Evaluation of hematological, serum biochemical and cerebrospinal fluid parameters in experimental bacterial meningitis in the calf.  
*Journal of Veterinary Medicine. Series A*, 1997, **44**, 55-63.
184. **Ndungu'u, J.M., Eckersall, P.D., and Jennings, F.W.**  
Elevation of the concentration of acute phase proteins in dogs infected with *Trypanosoma brucei*.  
*Acta Tropica*, 1991, **49**(2), 77-86.
185. **Noris-Garcia, E., Dorta-Contreras, A.J., Escobar-Perez, X., and Gonzalez-Hernandez, M.**  
Haptoglobin in cerebrospinal fluid as a marker of infectious process in central nervous system.  
*Revista de Neurologia*, 1999, **29**(2), 117-20 (résumé).
186. **Oehme, F.W.**  
Cytologic examination of the peritoneal fluid in the diagnosis of the cattle disease.  
*Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1969, **155**(12), 1923-1927.
187. **O'Hara, R., Murphy, E.P., Whitehead, A.S., FitzGerald, O., and Bresnihan, B.**  
Acute-phase serum amyloid A production by rheumatoid arthritis synovial tissue.  
*Arthritis Research*, 2000, **2**, 142-144.
188. **Ohtsuka, H., Kudo, K., Mori, S., Nagai, F., Hatsugaya, A., Tajima, M., Tamura, F., Koiwa, M., and Kawamura, S.**  
Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis.  
*Journal of Veterinary Medical Science*, 2001, **63**(6), 675-678.
189. **Östensson**  
Variations during lactation in total and differential leucocytes counts, N-acetyl-B-D-glucosaminidase, antitrypsin and serum albumin in foremilk and residual milk from non-infected quarters in the bovine.  
*Acta veterinaria Scandinavica*, 1993, **34**, 83-93.
190. **Owen, J.A., Better, F.C., and Hoban, J.**  
A simple method for the determination of serum haptoglobins.  
*Journal of Clinical Pathology*, 1960, **13**, 163-164.

191. **Paape, M.J., Kral, A.J., Desjardins, C., Schultze, W.D., and Miller, R.H.**  
Failure of either corticosteroids or ACTH to increase the leucocyte concentration in milk.  
*American Journal of Veterinary Research*, 1973, **34**, 353-361.
192. **Paradowski, M., Lobos, M., Kuydowicz, J., Krakowiak, M., and Kubasiewicz-Ujma, B.**  
Acute phase proteins in serum and cerebrospinal fluid in the course of bacterial meningitis.  
*Clinical Biochemistry*, 1995, **28**(28), 459-466.
193. **Parish, S.**  
Ruminant immunodeficiency diseases : failure of passive transfer.  
*in* Smith, B.P. *Large Animal internal Medicine : Second Edition*. St Louis, Missouri: Mosby, 1996. p 1857-1862.
194. **Patterson, S.D., Auer, D., and Bell, K.**  
Acute phase response in the horse: plasma protein changes associated with adjuvant induced inflammation.  
*Biochemistry International*, 1988, **17**(2), 257-64.
195. **Persson, K., Larsson, I., and Sandgren, C.H.**  
Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vivo and in vitro.  
*Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1993, **37**, 99-112.
196. **Philips, W.A.**  
The effect of assembly and transit stressors on plasma fibrinogen concentration of beef calves.  
*Canadian Journal of Comparative Medicine*, 1984, **48**, 35-41.
197. **Piercy, D.W.**  
Acute phase responses to experimental salmonellosis in calves and colibacillosis in chickens: serum iron and caeruloplasmin.  
*Journal of Comparative Pathology*, 1979, **89**(3), 309-19.
198. **Pillai, S.R., Kunze, E., Sordillo, L.M., and Jayarao, B.M.**  
Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health.  
*Journal of Dairy Science*, 2001, **84**, 1413-1420.
199. **Pirlot, A., Janssens, J., Skinner, G., and Godeau, J.M.**  
Quantitative determination of haptoglobin (HAP) in human and bovine sera by capillary zone electrophoresis (CZE).  
*Veterinary Research*, 1999, **30**, 483-493.
200. **Pizzini, C., Mussap, M., Plebani, M., and Fanos, V.**  
C-reactive protein and Serum Amyloid A protein in neonatal infections.  
*Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2000, **32**(3), 229-235.
201. **Poulsen, J.S.D.**  
Right-sided abomasal displacement in dairy cows : pre- and postoperative clinical and chemical findings.  
*Nordisk Veterinaermedicin*, 1974, **26**, 65-90.

202. **Pyörälä, S.**  
Indicators of inflammation to evaluate the recovery from acute bovine mastitis.  
Research in Veterinary Science, 1988, **45**, 166-169.
203. **Pyörälä, S. and Pyörälä, E.**  
Accuracy of methods using somatic cell count and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in milk to assess the bacteriological cure of bovine clinical mastitis.  
Journal of Dairy Science, 1997, **80**(11), 2820-2825.
204. **Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., and Hinchcliff, K.W.**  
Veterinary Medicine.:, 2000. p.
205. **Ray, A. and Ray, B.K.**  
Induction of Serum Amyloid A (SAA) gene by SAA-activating sequence-binding Factor (SAF) in Monocytes/Macrophages cells.  
Journal of Biological Chemistry, 1997, **272**, 28948-28953.
206. **Ray, A. and Ray, B.K.**  
Isolation and functional characterisation of cDNA of Serum Amyloid A-Activating Factor that binds to the serum Amyloid A promoter.  
Molecular and Cellular Biology, 1998, **18**(12), 7327-7335.
207. **Ray, A. and Ray, B.K.**  
Persistent expression of serum amyloid A during experimentally induced chronic inflammatory condition in rabbit involves differential activation of SAF, NF-Kappa-B and C/EBP transcription factors.  
Journal of Immunology, 1999, **163**, 2143-2150.
208. **Raynes, J.G., Eagling, S., and McAdam, K.P.**  
Acute-phase protein synthesis in human hepatoma cells : différential régulation of serum amyloid A (SAA) and haptoglobin by interleukin-1 and interleukin-6.  
Clinical and Experimental Immunology, 1991, **83**(3), 488-491.
209. **Rebhun, W.C. and DeLahunta, A.**  
Diagnosis and treatment of bovine listeriosis.  
Journal of the American Veterinary Medical Association, 1982, **180**(4), 395-398.
210. **Rebhun, W.C., DeLahunta, A., Baum, K.H., King, J., and Roth, L.**  
Compressive neoplams affecting the bovine spinal cord.  
Compendium of Continuing Education, 1984, **6**, 396-400.
211. **Regassa, F. and Noakes, D.E.**  
Acute phase protein response of ewes and the release of PGFM in relation to uterine involution and the presence of intrauterine bacteria.  
Veterinary Record, 1999, **144**(502-506).
212. **Reneau, J.K.**  
Effective use of Dairy Herd Improvement somatic cell counts in mastitis control.  
Journal of Dairy Science, 1986, **69**, 1708-1712.

213. **Richter, H.**  
Haptoglobin in domestic animals. III. Content in plasma and serum of ruminants and pigs under various physiological conditions.  
Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin, 1974, **28**, 505-519.
214. **Ruegg, P.L. and Reinemann, D.J.**  
Milk quality and mastitis tests.  
The Bovine Practitioner, 2002, **36**(1), 41-53.
215. **Saad, A.M. and Ostensson, K.**  
Flow cytofluorometric studies on the alteration of leucocytes populations in blood and milk during endotoxin-induced mastitis in the cow.  
American Journal of Veterinary Research, 1990, **51**, 1603-1607.
216. **Saini, P.K., RIAZ, M., Webert, D.W., Eckersall, P.D., and Young, C.R.**  
Development of a simple enzyme immunoassay for blood haptoglobin concentration in cattle and its application in improving food safety.  
American Journal of Veterinary Research, 1998, **59**(9), 1101-1107.
217. **Salonen, M., Hirvonen, J., Pyörälä, S., Sankari, S., and Sandholm, M.**  
Quantitative determination of bovine serum haptoglobin in experimentally induced *Escherichia coli* mastitis.  
Research in Veterinary Science, 1996, **60**, 88-91.
218. **Sattler, N., Fecteau, G., Hélie, P., Lapointe, J.M., Chouinard, L., Babkine, M., Desrochers, A., Couture, Y., and Dubreuil, P.**  
Etiology, forms and prognosis of gastrointestinal dysfunction resembling vagal indigestion occurring after surgical correction of right abomasal displacement.  
Canadian Veterinary Journal, 2000, **41**, 777-785.
219. **Schalm, O.W.**  
Plasma protein : fibrinogen ratios in routine clinical material from cats, dogs, horses and cattle - part III.  
California Veterinarian, 1970, **24**, 6-10.
220. **Schalm, O.W.**  
Hemogram in inflammatory disease of cattle.  
Modern Veterinary Practice, 1976, (october), 825-827.
221. **Schalm, O.W.**  
Bovine hematology.  
Modern Veterinary Practice, 1977, (November), 923-930.
222. **Schalm, O.W.**  
The bovine leucocytes : part I : general comments.  
Bovine Practice, 1980, **1**(6), 8-11.
223. **Schalm, O.W., Smith, R., and Kaneko, J.J.**  
Plasma protein : fibrinogen ratios in dogs, cattle and horses.  
California Veterinarian, 1970, **24**.

224. **Schroedl, W., Fuerll, B., Reinhold, P., Krueger, M., and Schuett, C.**  
A novel acute phase marker in cattle: lipopolysaccharide binding protein (LBP).  
Journal of Endotoxin Research, 2001, **7**(1), 49-52.
225. **Schumann, R.R. and Zweigner, J.**  
A novel acute-phase marker: lipopolysaccharide binding protein (LBP).  
Clinical Chemistry for Laboratory Medicine, 1999, **37**(3), 271-4.
226. **Scott, P.R.**  
Analysis of cerebrospinal fluid from field cases of some common ovine neurological diseases.  
British Veterinary Journal, 1992, **148**(1), 15-22.
227. **Scott, P.R.**  
A preliminary study of serum haptoglobin concentration as a prognosis indicator of ovine dystocia cases.  
British Veterinary Journal, 1992, **148**(4), 351-355.
228. **Scott, P.R.**  
Collection and interpretation of cerebrospinal fluid in ruminants.  
In Practice, 1993, **15**(6), 298-300.
229. **Scott, P.R.**  
A field study of ovine listerial meningo-encephalitis with particular reference to cerebrospinal fluid analysis as an aid to diagnosis and prognosis.  
British Veterinary Journal, 1993, **149**(2), 165-170.
230. **Scott, P.R.**  
Total protein and electrophoretic pattern of cerebrospinal fluid in sheep with some common neurological disorders.  
Cornell Veterinarian, 1993, **83**, 199-204.
231. **Scott, P.R.**  
Cerebrospinal fluid analysis in the differential diagnosis of spinal cord lesions in ruminants.  
In Practice, 1994, **16**(6), 301-303.
232. **Scott, P.R.**  
The collection and analysis of cerebrospinal fluid as an aid to diagnosis in ruminant neurological disease.  
British Veterinary Journal, 1995, **151**(6), 603-614.
233. **Scott, P.R., Aldridge, B.M., Clarke, M., and Will, R.G.**  
Cerebrospinal fluid studies in normal cows and cases of bovine spongiform encephalopathy.  
British Veterinary Journal, 1990, **146**, 88-90.
234. **Scott, P.R. and Penny, C.D.**  
A field study of meningoencephalitis in calves with particular reference to analysis of cerebrospinal fluid.  
Veterinary Record, 1993, **133**(5), 119-121.

235. **Shakespeare, P.G., Ball, A.J., and Spurr, E.D.**  
Serum protein changes after abdominal surgery.  
*Annals of Clinical Biochemistry*, 1989, **26**, 49-57.
236. **Sheffield, C.L., Kamps-Holtzapfle, C., Deloach, J.R., and Stanker, L.H.**  
Production and characterization of a monoclonal antibody against bovine haptoglobin and its use in an ELISA.  
*Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1994, **42**, 171-183.
237. **Sheldon, I.M., Noakes, D.E., Rycroft, A., and Dobson, H.**  
Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving.  
*Veterinary Record*, 2001, **148**, 172-175.
238. **Sheldrake, R.F., Hoare, R.J.T., and McGregor, G.D.**  
Lactation stage, parity and infection affecting somatic cells, electrical conductivity, and serum albumin in milk.  
*Journal of Dairy Science*, 1983, **66**, 542-547.
239. **Sheldrake, R.F., McGregor, G.D., and Hoare, R.J.**  
Somatic cell count, electrical conductivity, and serum albumin concentration for detecting bovine mastitis.  
*J Dairy Sci*, 1983, **66**(3), 548-55.
240. **Shim, B.S.**  
Increase in serum haptoglobin stimulated by prostaglandins.  
*Nature*, 1976, **259**, 326-327.
241. **Shimetani, N., Ichikawa, K., Shibuya, M., Mashiko, T., Matsuyama, N., Kannoh, Y., and Ohtani, H.**  
Quantitative levels of serum amyloid A protein and other proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with meningitis.  
*Rinsho Byori*, 1998, **46**(9), 930-935 (résumé).
242. **Shimetani, N., Shimetani, K., and Mori, M.**  
Levels of three inflammation markers, C-reactive protein, serum amyloid A protein and procalcitonin, in hte serum and cerebrospinal fluid of patient with meningitis.  
*Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 2001, **61**(7), 567-574.
243. **Shuster, D.E., Kehrli, M.E., and Stevens, M.G.**  
Cytokine production during endotoxin-induced mastitis in lactating dairy cows.  
*American Journal of Veterinary Research*, 1993, **54**(1), 80-85.
244. **Skinner, G.**  
International standardization of acute phase proteins.  
*Veterinary Clinical Pathology*, 2001, **30**(1), 2-7.
245. **Skinner, G., Brown, R.A.L., and Roberts, L.**  
Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions.  
*Veterinary Record*, 1991, **128**, 147-149.

246. **Skinner, J.G. and Roberts, L.**  
Haptoglobin as an indicator of infection in sheep.  
Veterinary Record, 1994, **134**, 33-36.
247. **Smith, B.L., Donovan, G.A., Risco, C.A., Young, C.R., and Stanker, L.H.**  
Serum haptoglobin concentrations in Holstein dairy cattle with toxic puerperal metritis.  
Veterinary Record, 1998, **142**, 83-85.
248. **Smith, G.W., Constable, P.D., and Morin, D.E.**  
Ability of hematologic and serum biochemical variables to differentiate Gram-negative and Gram-positive mastitis in dairy cows.  
Journal of Veterinary Internal Medicine, 2001, **15**(394-400).
249. **Smith, J.E., Chavey, P.S., and Andrews, G.A.**  
Semiautomatic and robotic methods for determining serum haptoglobin levels.  
Veterinary Clinical Pathology, 1998, **27**<sup>2</sup>(1), 11-14.
250. **Smith, R.D.**  
Decision analysis in the evaluation of diagnostic test.  
Journal of the American Veterinary Medical Association, 1993, **203**(8), 1184-1192.
251. **Solter, P.F., Hoffmann, W.E., Hungerford, L.L., Siegel, J.P., St Denis, S.H., and Dorner, J.L.**  
Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs.  
American Journal of Veterinary Research, 1991, **52**(10), 1738-1742.
252. **Spooner, R.L. and Miller, J.K.**  
The measurement of haemoglobin reactive protein in ruminants as an aid to the diagnosis of acute inflammation.  
Veterinary Record, 1971, **88**, 2-4.
253. **St. Jean, G., Yvorchuk-St. Jean, K., Anderson, D.E., and Moore, W.E.**  
Cerebrospinal fluid constituents collected at the atlanto-occipital site of xylazine hydrochloride sedated healthy 8-week-old Hostein calves.  
Canadian Journal of Veterinary Research, 1997, **61**, 108-112.
254. **Sutton, R.H. and Hobman, B.**  
The value of plasma fibrinogen estimations in cattle : a comparison with total leucocyte and neutrophil counts.  
New Zealand Veterinary Journal, 1975, **23**(3), 21-27.
255. **Tamura, K., Yatsu, T., Itoh, H., and Motoi, Y.**  
Isolation, characterization and quantitative measurement of serum  $\alpha$ 1-Acid glycoprotein in cattle.  
Japanese Journal of Veterinary Science, 1989, **51**(5), 987-994.
256. **Tennant, B.**  
Hematology of the neonatal calf. II. Response associated with acute enteric infections, gram-negative septicemia, and experimental endotoxemia.  
Cornell Veterinarian, 1975, **65**, 457-475.

257. **Theilen, G.H. and Madewell, B.R.**  
Hématopoietic neoplasms, sarcomas and related condition : part V: Bovine.  
*in* Theilen, G.H. and Madewell, B.R. *Veterinary Cancer Medicine*, Second Edition.  
Philadelphia: Lea et Febiger, 1987. p 408-430.
258. **Theilen, G.H., Schalm, O.W., Straub, O.C., and Hughes, J.P.**  
Bovine hematology. I; Leucocytes response to acute bovine mastitis.  
*Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1959, **1**, 481-885.
259. **Thompson, D.**  
The value of acute phase protein measurements in clinical practice.  
*Annals of Clinical Biochemistry*, 1992, **29**, 123-131.
260. **Tizard, I.R.**  
Innate Immunity : inflammation.  
*in* Company, W.S. *Veterinary Immunology : an introduction*. sixth edition. Philadelphia:  
W.B. Saunders, 2000. p 36-46.
261. **Tucker, P.C. and Sack, G.**  
Expression of serum amyloid A genes in mouse brain : unprecedented response to  
inflammatory mediators.  
*FASEB Journal*, 2001, **15**, 2241-2246.
262. **Tvedten, H.W.**  
Clinical pathology of bovine neurologic disease.  
*Veterinary Clinics of North America : Food Animal Practice*, 1987, **3**(1), 25-43.
263. **Uchida, E., Atoh, N., and Takahashi, K.**  
Appearance of haptoglobin from cows at parturition.  
*Journal of Veterinary Medical Science*, 1993, **55**(5), 893-894.
264. **Uchida, E., Katoh, N., and Takahashi, K.**  
Induction of serum haptoglobin by administration of ethionine to cows.  
*Journal of Veterinary Medical Science*, 1993, **55**(3), 501-502.
265. **Uhlar, C.M. and Whitehead, A.S.**  
Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant.  
*European Journal of Biochemistry*, 1999, **265**, 501-523.
266. **Urieli-Shoval, S., Linke, R.P., and Matzner, Y.**  
Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and  
disease states.  
*Current Opinion in Hematology*, 2000, **7**, 64-69.
267. **Van Der Kolk, J.H., Alsemgeest, S.P.M., Wessing, T., and Niewold, T.A.**  
Failure of adrenocorticotrophic hormone to release serum amyloid A in cattle.  
*Research in Veterinary Science*, 1992, **52**, 113-114.

268. **Vestweber, J.G., Klemm, R.D., Leipold, H.W., Johnson, D.E., and Bailie, W.E.**  
Clinical and pathological studies of experimentally induced *Pasteurella haemolytica* pneumonia in calves.  
American Journal of Veterinary Research, 1990, **51**(11), 1792-1798.
269. **Waage, A., Slupphaug, G., and Shalaby, R.**  
Glucocorticoids inhibit the production of IL-6 from monocytes, endothelial cells and fibroblast.  
European Journal of Immunology, 1990, **20**, 2439-2443.
270. **Wassell, J.**  
Haptoglobin : function and polymorphism.  
Clinical Laboratory, 2000, **466**(11-12), 547-552.
271. **Wegner, T.N., Schuh, J.D., Nelson, F.E., and Stott, G.H.**  
Effect of stress on blood leucocytes and milk somatic cell counts in dairy cows.  
Journal of Dairy Science, 1976, **59**, 949-953.
272. **Weiss, D.J. and Perman, V.**  
Assessment of the hematopoietic system in ruminants.  
Veterinary Clinics of North America : Food Animal Practice, 1992, **8**(2), 411-428.
273. **Welles, E.G., Tyler, J.W., Sorjonen, D.C., and Whatley, E.M.**  
Composition and analysis of cerebrospinal fluid in clinically normal adult cattle.  
American Journal of Veterinary Research, 1992, **53**(11), 2050-2057.
274. **Werling, D., Sutter, F., Arnold, M., and Kun, G.**  
Characterisation of the acute phase response of heifers to a prolonged low dose infusion of lipopolysaccharide.  
Research in Veterinary Science, 1996, **61**, 252-257.
275. **Westermarck, P., Johnson, K.H., Westermarck, G.T., Sletten, K., and D.W., H.**  
Bovine amyloid protein AA : isolation and amino acid sequence analysis.  
Comparative Biochemistry and Physiology. B, 1986, **85**(3), 609-614.
276. **Wever, P. and Emanuelson, U.**  
Effects of systemic influences and intramammary infection on differential and total somatic cell counts in quarter milk samples from dairy cows.  
Acta veterinaria Scandinavica, 1989, **30**, 465-474.
277. **Whicher, J.T., Chambers, R.E., Higginson, J., Nashef, L., and Higginns, P.R.**  
Acute phase response of serum amyloid A protein and C reactive protein to the common cold and influenza.  
Journal of Clinical Pathology, 1985, **38**(3), 312-316.
278. **Whitlock, R.H. and Buergelt, C.**  
Preclinical and clinical manifestation of paratuberculosis (including pathology).  
Veterinary Clinics of North America : Food Animal Practice, 1996, **12**(2), 345-356.

279. **Whitney, M.S.**  
Hematology of food animals.  
in Howard, J.L. Current Veterinary Therapy IV. Food animal practice. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. p 482-495.
280. **Wilson, A.D., Hirsch, V.M., and Osborne, A.D.**  
Abdominocentesis in cattle : technique and criteria for diagnosis of peritonitis.  
Canadian Veterinary Journal, 1985, **26**, 74-80.
281. **Wilson, J.**  
Clinical application of cerebrospinal fluid creatine phosphokinase determination.  
Journal of the American Veterinary Medical Association, 1977, **171**(2), 200-202.
282. **Wittum, T.E., Young, C.R., Stanker, L.H., Griffin, D.D., Perino, L.J., and Littledike, E.T.**  
Haptoglobin response to clinical respiratory tract disease in cattle.  
American Journal of Veterinary Research, 1996, **57**(5), 646-649.
283. **Yamada, T.**  
Sérum amyloid A (SAA) : a concise review of biology, assay methods and clinical usefulness.  
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 1999, **37**(4), 381-388.
284. **Yamada, T., Nomata, Y., Sugita, O., and Okada, M.**  
A rapid method for measuring serum amyloid -A protein by latex agglutination nephelometric immunoassay.  
Annals of Clinical Biochemistry, 1993, **30**, 72-76.
285. **Yamamoto, M., Oohashi, T., Katoh, N., and Oikawa, S.**  
Increased serum concentration of apolipoprotein C-III and its greater distribution to chylomicrons than the high-density lipoprotein fraction in a calf with hyperlipidemia.  
Journal of veterinary Medical Science, 2000, **62**(10), 1033-1039.
286. **Yamamoto, O., Katoh, N., and Adachi, Y.**  
The presence of the two low molecular mass proteins immunologically related to 14 Kilodalton serum amyloid A in the lipoprotein fraction and their decreased serum concentration in calves with experimentally induced pneumonia.  
Journal of Veterinary Medical Science, 1998, **60**, 181-187.
287. **Yoshino, K., Katoh, N., Takahashi, K., and Yuasa, A.**  
Purification of a protein from sera of cattle with hepatic lipidosis, and identification of the protein as haptoglobin.  
American Journal of Veterinary Research, 1992, **53**(6), 951-956.
288. **Yoshino, K., Katoh, N., Takahashi, K., and Yuasa, A.**  
Possible involvement of protein kinase C with induction of haptoglobin in cows by treatment with dexamethasone and by starvation.  
American Journal of Veterinary Research, 1993, **54**(5), 679-694.

289. **Young, C.R., Eckersall, P.D., Saini, P.K., and Stanker, L.H.**  
Validation of immunoassays for bovine haptoglobin.  
*Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1995, **49**, 1-13.
290. **Young, C.R., Wittum, T.E., Stanker, L.H., Perino, L.J., Griffin, D.D., and Littlelike, E.T.**  
Serum haptoglobin concentrations in a population of feedlot cattle.  
*American Journal of Veterinary Research*, 1996, **57**(2), 138-141.
291. **Zank, W. and Schlatterer, B.**  
Assessment of subacute mammary inflammation by soluble biomarkers in comparison to somatic cell counts in quarter milk samples from dairy cows.  
*Journal of Veterinary Medicine*, 1998, **45**, 41-51.