

- Table des matières -

Introduction

- Première partie -

Etude bibliographique

1. Les mammites en élevage ovin laitier	25
Introduction : La filière ovine laitière du Rayon de Roquefort.....	25
1.1 – Importance des mammites.....	27
1.1.1. Aspects économiques	27
1.1.1.1. Chute de production et réforme.....	27
1.1.1.2. Coût des traitements, temps d’attente et non livraison du lait	28
1.1.1.3. Paiement du lait en fonction de sa qualité cellulaire.....	28
1.1.1.4. Coût pour le transformateur	29
1.1.2. Aspects hygiéniques et sanitaires	29
1.1.3. Aspects réglementaires.....	30
1.2 - Etiologie et épidémiologie des mammites ovines.....	32
1.2.1. Mammites cliniques	32
1.2.2. Mammites subcliniques.....	34
1.3 - Les comptages cellulaires et leur importance dans la gestion des mammites	36
1.3.1. Comptages de cellules somatiques individuels	36
1.3.2. Comptages de cellules somatiques de tank	37
1.3.3. Applications opérationnelles	38
1.4 – Intégration des comptages cellulaires dans le schéma de sélection ovin lait.....	40
1.4.1. Paramètres génétiques des CCS	40
1.4.2. Inclusion des CCS dans le schéma de sélection Lacaune lait	44
2- Caractérisation bactériologique de <i>Staphylococcus aureus</i>	45
Introduction : facteurs responsables du pouvoir pathogène de <i>Staphylococcus aureus</i>	45
2.1 - Les toxines	47
2.1.1. Les cytotoxines.....	47
2.1.2. Les toxines à tropisme autre que cellulaire	50
2.1.2.1. Les entérotoxines staphylococciques	50
2.1.2.2. La toxine du syndrome du choc toxique	51
2.2 – Les enzymes	52
2.3 – Les composants de surface.....	52
2.3.1. Adhésines	52
2.3.2. Exopolysaccharides capsulaires	53

3- Interactions entre <i>Staphylococcus aureus</i> et son hôte dans le cas des mammites	55
3.1- Réponse de la mamelle : modifications histopathologiques	55
3.2- Excrétion bactérienne suite à une inoculation	57
3.2.1. Localisation des bactéries dans une mamelle infectée	57
3.2.2. Cycle d'excrétion des bactéries dans le lait	58
3.3 - Réponse cellulaire	60
3.3.1. Les cellules du lait d'une mamelle saine.....	60
3.3.2. Les types cellulaires du lait d'une mamelle infectée.....	62
3.3.3. Nature cyclique de l'activation leucocytaire concomitante à l'excrétion	62

- Deuxième partie -

Etude expérimentale : Inoculation intra-mammaire de *Staphylococcus aureus* chez la brebis

1- Matériel et méthodes.....	67
1.1- Sélection des animaux.....	67
1.2- Protocole quotidien d'examen clinique et de prélèvements	68
1.2.1. Fréquence de traite, alimentation des brebis	68
1.2.2. Prise de température	69
1.2.3. Examen clinique de la mamelle pleine.....	69
1.2.4. Prélèvements de lait pour les comptages cellulaires du lait des premiers jets	69
1.2.5. Traite complète, mesure de production, lait de mélange.....	70
1.2.6. Prélèvements aseptiques de lait.....	71
1.2.7. Couleur de la mamelle.....	71
1.2.8. Palpation de la mamelle vide	72
1.2.9. Calcul d'une note clinique.....	74
1.3- Définition et choix de l'inoculum	76
1.3.1. Définition de l'inoculum	76
1.3.2. Souches utilisées pour l'essai préliminaire	76
1.3.3. Préparation des inoculums	77
1.4 - Inoculations.....	78
1.5 – Analyses bactériologiques.....	78
1.5.1. Vérification de l'absence d'infection préalable ou de co-infection	78
1.5.2. Dénombrement	78
1.6 - Comptages cellulaires	78
2- Essai 1 : résultats.....	81
2.1 – Résultats cliniques.....	81
2.1.1. Clinique ante-mortem.....	81
2.1.1.1. Clinique aiguë et générale	81
2.1.1.2. Clinique chronique : signes locaux	83
2.1.1.3. Notes cliniques mammaires	84

2.1.2. Résultats d'autopsie.....	85
2.1.2.1. Brebis mortes en cours d'expérimentation.....	85
2.1.2.2. Brebis euthanasiées en fin d'expérimentation.....	86
2.2 - Production laitière.....	89
2.3 - Comptages cellulaires.....	91
2.4 - Bactériologie.....	93
3- Essai 2 : résultats.....	95
3.1 – Résultats cliniques.....	95
3.1.1. Clinique ante-mortem.....	95
3.1.1.1. Clinique aiguë et générale.....	95
3.1.1.2. Clinique chronique : signes locaux.....	95
3.1.2. Résultats d'autopsie.....	98
3.1.2.2. Brebis morte en cours d'expérimentation.....	98
3.1.2.2. Brebis euthanasiées en fin d'expérimentation.....	98
3.2 – Production laitière.....	102
3.3 – Comptages cellulaires.....	105
3.4 – Bactériologie.....	106
4- Discussion.....	107
4.1 - Discussion des matériels et des méthodes.....	107
4.1.1. Choix des brebis.....	107
4.1.1.1. Les ovins comme animal-modèle et animal-cible.....	107
4.1.1.2. Les lots : effet lignée et effet stade de lactation.....	108
4.1.2. Choix de la souche.....	108
4.1.3. Choix de l'inoculum.....	109
4.1.3.1. Préparation des inoculums.....	109
4.1.3.2. Titres inoculés.....	110
4.1.3.3. Modalité d'inoculation.....	110
4.1.4. Méthodologie de suivi des animaux.....	111
4.1.5. Comptages cellulaires et suivi bactériologique.....	112
4.2 - Discussion des résultats.....	112
4.2.1. Résultats de l'essai 1.....	112
4.2.1.1. Clinique.....	112
4.2.1.2. Influence de la lignée.....	113
4.2.2. Résultats de l'essai 2.....	114
4.2.2.1. Expression clinique et fonctionnelle.....	114
4.2.2.2. Comptages cellulaires.....	115
4.2.2.3. Excrétion bactérienne galactophore.....	117
4.2.3. Bilan des deux essais, discutés en comparaison avec l'essai préliminaire et les résultats observés en conditions naturelles à La Fage.....	118
4.2.3.1. Comparaison avec l'essai préliminaire.....	118
4.2.3.2. Comparaison avec les résultats observés en conditions naturelles.....	119
4.3 – Suites à donner aux essais.....	119
4.3.1. Modalités méthodologiques envisagées pour les essais suivants.....	119

4.3.1.1. Changement de modalité d'infection expérimentale en conservant la même souche.....	119
4.3.1.2. Changement d'espèce staphylococcique pour utiliser <i>Staphylococcus epidermidis</i>	120
4.3.1.3. Changement de l'état métabolique de la souche et utilisation dans un état plus végétatif.....	120
4.4.1.4. Schémas expérimentaux envisagés	121
4.3.2. Hypothèses face aux résultats des essais 2005.....	121
 - Conclusion -	123
 - Sources bibliographiques -	127

- Liste des tableaux -

Tableau 1 : Grille de paiement du lait de brebis dans le Rayon de Roquefort (Confédération Générale de Roquefort, campagne 2007)	29
Tableau 2 : Pourcentages des types cellulaires dans un lait de brebis bactériologiquement négatif (Bergonier <i>et al.</i> , 2003) :	61
Tableau 3 : Pourcentages des types cellulaires dans un lait de quartier infecté de brebis Bergonier <i>et al.</i> , 2003) :	62
Tableau 4 : Résultats d'autopsie des brebis CCS- (lignée basse) de l'essai 1	87
Tableau 5 : Résultats d'autopsie des brebis CCS+ (lignée haute) de l'essai 1	88
Tableau 6 : Résultats d'autopsie pour les brebis CCS – (lignée basse) de l'essai 2 :	100
Tableau 7 : Résultats d'autopsie pour les brebis CCS+ (lignée haute) de l'essai 2	101

- Liste des figures -

Figure 1 : Fréquences d'isolement des bactéries à l'origine de mammites sporadiques aiguës ou suraiguës dans le rayon de Roquefort et dans les Pyrénées-Atlantiques (Bergonier, 2005).....	33
Figure 2 : Etiologie des mammites subcliniques des brebis laitières (Bergonier, 2006)	34
Figure 3 : Courbes des températures en moyennes géométriques par lot (essai 1).....	83
Figure 4 : Notes cliniques des brebis de l'essai 1 côté par côté et lot par lot	84
Figure 5 : Production laitière totale de chaque lot de l'essai 1	89
Figure 6 : Moyennes géométriques des productions laitières quotidiennes de chaque lot de l'essai 1 (demi-mamelles inoculées et non inoculées)	90
Figure 7 : Ratio de la moyenne géométrique de la production laitière du côté inoculé à la moyenne géométrique de la production laitière des deux côtés avant inoculation (essai 1)	91
Figure 8 : Moyennes géométriques des comptages de cellules somatiques (CCS) par côté et par lot (essai 1)	92
Figure 9 : Scores des cellules somatiques (SCS) moyens par côté et par lot lors de l'essai 1	93
Figure 10 : Excrétion bactérienne moyenne géométrique par lot (essai 1).....	94
Figure 11 : Courbes des températures en moyennes géométriques par lot (essai 2).....	97
Figure 12 : Notes cliniques des brebis de l'essai 2 côté par côté et lot par lot.....	96
Figure 13 : Production laitière totale de chaque lot (essai 2).....	102
Figure 14 : Moyennes géométriques des productions laitières des deux côtés par lot (essai 2)	103
Figure 15 : Production laitière moyenne du côté inoculé (moyenne arithmétique) (essai 2)	103
Figure 16 : Production laitière moyenne du côté non inoculé (moyenne arithmétique) (essai 2).....	104
Figure 17 : Ratio de la moyenne géométrique de la production laitière du côté inoculé /à la moyenne géométrique de la production laitière des 2 côtés avant inoculation (essai 2)	105
Figure 18 : Comptages des cellules somatiques du côté inoculé (essai 2).....	105
Figure 19 : Excrétion galactophore des deux lignées (essai 2)	106

- Introduction -

Les mammites représentent la deuxième cause de réforme en élevage ovin laitier, après les cas de production laitière insuffisante (respectivement 7,2 et 13 % en moyenne) (Barillet *et al.*, 1999). A ceci s'ajoute une importance économique, hygiénique et réglementaire de ces pathologies, d'où leur place importante dans les filières laitières quelle que soit l'espèce concernée, et la volonté mise en œuvre pour réduire leur incidence.

Une mammite est une inflammation de la mamelle d'origine principalement bactérienne, qui se traduit très fréquemment par une élévation du nombre des cellules somatiques du lait. Actuellement, pour lutter contre les mammites, les acteurs de la filière traitent les femelles touchées (principalement au tarissement) ou les réforment. Accessoirement, ils tentent d'agir sur les sources de germe, les mécanismes de transmission et les facteurs de susceptibilité. Il n'existe pas à ce jour de vaccin ayant fait la preuve publiée de son efficacité.

Cependant, depuis quelques années se met en place une sélection génétique d'animaux présumés plus résistants à cette pathologie. L'héritabilité des comptages cellulaires permet d'engager un schéma de sélection génétique basé sur ce critère. Ainsi, en filière bovine, l'indexation des taureaux comprend en France un indice de comptage cellulaire depuis 1997. En filière ovine, cette sélection a débuté en 2002 pour les béliers du rayon Roquefort. L'objectif actuel est de réaliser une diminution linéaire des comptages cellulaires moyens qui sont le reflet des mammites subcliniques et chroniques. Cependant, l'une des questions que se posent les généticiens et les pathologistes est celle de la résistance (ou de la sensibilité), à terme dans ce type de schéma, d'animaux à lait devenus physiologiquement paucicellulaires. En effet, les cellules sentinelles (macrophages en particulier) y seront alors de moins en moins nombreuses. Si des comptages de cellules somatiques (CCS) diminués peuvent traduire une moindre inflammation moyenne des mamelles, une trop forte réduction ne pourrait-elle pas nuire à la capacité de la vache ou de la brebis à recruter rapidement des leucocytes (diapédèse) et/ou à répondre à une infection intra-mammaire ?

Cette thèse s'inscrit dans un travail de plus longue haleine mené conjointement par plusieurs équipes de l'INRA (INRA-SAGA, PII et UMR INRA-ENVIT 1225 « Interactions hôtes-agents pathogènes ») afin de répondre, en particulier, aux questions précédentes, du point de vue clinique, génétique, bactériologique et immunologique. La brebis a été utilisée comme animal-modèle et animal-cible pour des raisons pratiques, statistiques et matérielles, les schémas de sélection étant basés sur les mêmes principes chez les espèces bovine et ovine.

Dans une première partie bibliographique, nous présenterons l'importance des mammites en filière ovine, leur étiologie et leur épidémiologie. Nous nous attacherons ensuite à étudier le pouvoir pathogène de *Staphylococcus aureus*. Enfin, nous étudierons les interactions entre cette bactérie et son hôte dans le cas des mammites, en nous appuyant sur des reproductions expérimentales d'infections intra-mammaires à *Staphylococcus aureus*, afin de comprendre et d'analyser les expérimentations décrites par la suite.

Dans une seconde partie, nous présenterons les études expérimentales (essai 1 et essai 2) réalisées en 2005 à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse : il s'agissait d'inoculations intra-mammaires de *Staphylococcus aureus* chez des brebis Lacaune issues de deux lignées génétiques divergentes sur le critère des comptages cellulaires. Ces brebis ont été suivies cliniquement et leur lait a été analysé d'un point de vue bactériologique et immunologique. Les résultats de ces deux études sont présentés et discutés.

- Première partie -

Etude bibliographique

Il est nécessaire ici de présenter l'importance des mammites au sein des filières laitières, et la sélection qui est effectuée afin de contrer cette pathologie, ces deux problèmes étant à l'origine des expérimentations débutées en 2004 par des essais préliminaires, et de la présente thèse.

1. Les mammites en élevage ovin laitier

Introduction : La filière ovine laitière du Rayon de Roquefort

Les brebis laitières sont élevées traditionnellement en France depuis maintes décennies, en particulier dans trois régions montagneuses du Sud : le Rayon Roquefort avec la race Lacaune, les Pyrénées-Atlantiques avec les races Manech et Basco-Béarnaise, et la Corse avec la race Corse. En parallèle, hors des bassins traditionnels, la production de lait de brebis se développe, principalement en Midi-Pyrénées, Languedoc-Roussillon, Rhône-Alpes et Provence-Alpes-Côte-d'Azur. Dans ces régions, elle concerne un peu plus de 300 élevages qui produisent un volume de lait estimé à 10 millions de litres par an, soit une production supérieure à celle de la Corse (Morin et Fraysse, 2003).

Dans le Rayon de Roquefort, on compte 2355 livreurs de lait, qui ont une production de l'ordre de 176,6 millions de litres (résultats de la campagne laitière 2003), soit 75% de la production totale de lait de brebis en France. Parallèlement à l'augmentation des surfaces agricoles utiles, le nombre de brebis par exploitation a fortement augmenté. C'est dans le Rayon de Roquefort que les troupeaux sont les plus grands : un peu plus de 300 brebis en moyenne. Le niveau de production moyen par brebis est de 254 litres par saison, et peut aller jusqu'à 289 litres pour les élevages à forte production qui cherchent une plus-value sur le co-produit viande. Dans les années 1960, la Lacaune était une race mixte lait-viande ; cette situation a évolué pendant les quarante dernières années de façon radicale, puisque actuellement c'est une race laitière très haute productrice, qui a tout de même maintenu ses capacités de production de viande (Barillet *et al.*, 2001).

Traditionnellement, la production de lait de brebis est saisonnée de février à juillet environ. Pour la quasi-totalité des élevages, les mise-bas sont désaisonnées par rapport au cycle naturel : elles ont lieu d'octobre à janvier pour les brebis adultes, et sont un peu plus tardives pour les agnelles. Les agneaux sont allaités durant un mois puis commercialisés ou engraisés dans des structures collectives jusqu'à l'âge de 100 à 120 jours. La période de

traite dure environ six à huit mois dans le rayon Roquefort. Elle démarre après le sevrage des agneaux et se termine en début d'été. La traite est mécanique dans plus de 95% des élevages (Lagriffoul *et al.*, 1996 a) et seulement 2% des exploitations transforment le lait à la ferme.

Le lait est en totalité valorisé dans le cadre de l'Interprofession de Roquefort. La large majorité des exploitations du rayon Roquefort (92%) sont engagées dans un signe officiel de qualité : il s'agit de l'AOC Roquefort (Appellation d'Origine Contrôlée).

Quel impact de la réforme de la PAC ? L'Interprofession de Roquefort a mis en place une politique de maîtrise de la production. Malgré cela, les éleveurs de cette région ont jusqu'à présent maintenu leurs effectifs de brebis, en particulier pour continuer à percevoir les primes liées à la production de viande ovine, et la collecte ne s'est pas vraiment stabilisée. A l'avenir, un découplage même partiel des primes ovines pourrait permettre d'envisager une baisse de l'effectif des brebis sans entraîner obligatoirement une baisse du résultat économique. Sur le rayon de Roquefort, les reprises d'exploitations se font jusqu'à présent sans trop de difficultés, mais certaines exploitations sont aujourd'hui de dimensions relativement importantes et fortement mécanisées. Cela se traduit par des capitaux qui sont parfois difficiles à transmettre d'une génération à l'autre.

L'importance des mammites est d'autant plus palpable dans ces élevages à haute production du bassin de Roquefort. Elle se rapporte principalement à des aspects économiques, hygiéniques (pour les consommateurs de produits laitiers) et réglementaires.

1.1– Importance des mammites

1.1.1. Aspects économiques

La mammite est une pathologie qui affecte de façon très négative l'économie d'un troupeau laitier ovin (Ranucci *et al.*, 1999).

1.1.1.1. Chute de production et réforme

Les brebis touchées cliniquement ou dont les mammites sont cause d'une chute de production sont souvent réformées.

Un des troupeaux INRA, au domaine de La Fage dans l'Aveyron (Barillet *et al.*, 1999), composé d'environ 570 brebis et conduit de manière traditionnelle (bassin de Roquefort), a été suivi pendant 5 ans. La première cause de réforme (environ 13% des brebis par an) était un niveau de production laitière insuffisant. La seconde cause était la santé de la mamelle : chaque année, le nombre de brebis réformées pour cause de mammites cliniques était en moyenne de 7,2%, et cela variait de 5,6% des brebis en première lactation à 8,8% en troisième lactation et plus. La mammite clinique stricte (avec ou sans mort rapide de la brebis) était suivie par une réforme immédiate, et arrivait tôt en lactation (entre l'agnelage et le second mois de lactation) : l'incidence des mammites cliniques strictes était de 3,8% chez les agnelles au 32^{ème} jour de lactation, contre 4,8% chez les adultes au 46^{ème} jour de lactation. Les mammites chroniques (généralement détectées par palpation mammaire) étaient plus fréquentes chez les adultes et arrivaient plus tard : 4,0% des brebis adultes réformées au 157^{ème} jour contre 1,8% des agnelles réformées au 129^{ème} jour.

Les mammites sont aussi responsables d'une augmentation des taux de mortalité des brebis et d'une diminution du gain de poids des agneaux, voire d'une mortalité des agneaux.

1.1.1.2. Coût des traitements, temps d'attente et non livraison du lait

Le traitement moyen par brebis est coûteux dans les conditions de terrain en comparaison de la valeur de la réforme et du rétablissement qu'on peut en attendre (Bergonier *et al.*, 2005). Quand on traite des brebis, on distingue les infections cliniques et subcliniques. Pour les mammites subcliniques, un traitement sélectif au tarissement (touchant seulement les mamelles atteintes) est à préférer à un traitement systématique. La limitation du nombre de traitement permet de limiter le coût et de mettre ce traitement en œuvre plus facilement. On réduit ainsi l'utilisation d'antibiotiques et le risque de contamination diathétique environnementale qui peut en découler (Bergonier *et al.*, 2001). L'examen de la mamelle (pour les mammites cliniques) et les CCS individuels ou la mise en œuvre d'un CMT (Californian Mastitis Test) permettent de sélectionner les brebis à traiter.

Traiter des mammites entraîne également une perte économique du fait du temps d'attente et de la non livraison du lait. La réglementation européenne prescrit un temps d'attente de 7 jours pour le lait après un traitement intra-mammaire hors label sur des petits ruminants en lactation (Bergonier *et al.*, 2005). Les mammites en lactation sont cependant très rares dans le rayon de Roquefort. Pour ce qui est des traitements hors lactation, le risque de présence de résidus est quasiment nul à l'agnelage, et, a fortiori, lors de la première livraison de lait (Lohuis *et al.*, 1995), soit après un mois d'allaitement en système Roquefort.

1.1.1.3. Paiement du lait en fonction de sa qualité cellulaire

Une mammite entraîne une augmentation des CCS. Or le paiement du lait s'effectue selon sa qualité cellulaire. Des CCS de tank sont réalisés et des pénalités appliquées s'ils dépassent certains seuils.

Voici par exemple la grille de paiement du lait de brebis dans le Rayon de Roquefort (Confédération générale des producteurs de lait de brebis et des industriels de Roquefort, réglementation, campagne 2007):

Tableau 1 : Grille de paiement du lait de brebis dans le Rayon de Roquefort (Confédération Générale de Roquefort, campagne 2007)

Grade	Moyenne arithmétique des résultats du mois (en cellules par mL)	Incidence sur le prix (en euros par 1000 L)
A	≤ 500 000	lait super A (possible)
B	500 000 à 800 000	0
C	0,8 à 1,1 million	- 30,50
D	> 1,1 million	- 68,60

1.1.1.4. Coût pour le transformateur

Des changements qualitatifs du lait peuvent affecter les procédés de transformation et les caractéristiques qualitatives des produits laitiers obtenus.

1.1.2. Aspects hygiéniques et sanitaires

La colonisation des denrées par *Staphylococcus aureus*, principal agent de mammites chez les ovins, est associée avec une forme de gastroentérite qui se manifeste cliniquement une à deux heures après l'ingestion par des vomissements avec ou sans diarrhée, une douleur abdominale, et éventuellement des tremblements et des maux de tête (Pasqualatto *et al.*, 1998 ; Simeao *et al.*, 2002). On parle d'empoisonnement alimentaire staphylococcique ; il résulte de l'ingestion d'une ou plusieurs entérotoxines staphylococciques dans la nourriture. Des signes de toxicité systémique (fièvre ou hypotension) sont rarement observés. C'est une pathologie qui se résout normalement d'elle-même en 24 à 48 heures (Dinges *et al.*, 2000).

Les contaminations de produits laitiers par *Staphylococcus aureus* ou ses entérotoxines peuvent être à l'origine d'épidémies chez les consommateurs. Deux exemples ressortent dans la bibliographie. En 1997, à Caracas, on a rapporté une intoxication massive de 462 patients suite à la consommation de lait non pasteurisé et de pancakes avec du jambon (Pasqualatto *et*

al., 1998). Les analyses de laboratoire (microbiologiques, physicochimiques et toxiques), la clinique, et l'étude épidémiologique des cas ont permis de montrer qu'il s'agissait d'un cas de maladie bactérienne issue de la nourriture (*S. aureus* et entérotoxines A et C), celle-ci ayant été contaminée par une manipulation incorrecte, une réfrigération et une distribution inappropriées. Au Brésil en 1999 ont eu lieu deux épidémies d'intoxication alimentaire touchant au total 378 personnes qui avaient consommé dans un cas du fromage au lait cru, dans l'autre du lait non pasteurisé (Simeao *et al.*, 2002). Des échantillons des deux produits ont été analysés. L'analyse du fromage et du lait cru de la première épidémie a montré qu'ils contenaient du *S. aureus* dans des quantités allant de $2,4.10^3$ à $2,0.10^8$ UFC/g et qu'il y avait eu production d'entérotoxines SEA, SEB et SEC. L'analyse du lait non pasteurisé indiquait la présence de Staphylocoques Coagulase négative cette fois-ci, dans des quantités supérieures à $2,0.10^8$ UFC/g, et la production d'entérotoxines SEC et SED. Les entérotoxines spécifiques détectées supposaient que la source de contamination venait dans le premier cas des manipulateurs du fromage, et dans le second cas, de mammites cliniques.

Une étude norvégienne (Jorgensen *et al.*, 2005) s'est intéressée aux sources potentielles de contamination des fromages au lait cru par *Staphylococcus aureus* dans une ferme bovine laitière de petits producteurs. Dans cette ferme, les analyses ont permis de trouver du *S. aureus* dans le lait de 10 vaches sur 11, ainsi que dans les divers échantillons prélevés sur l'éleveur, l'équipement, l'environnement, et le fromage produit. La bactérie a été trouvée partout dans l'élevage : elle s'étend à l'environnement, à l'équipement et aux produits. Des stratégies pour diminuer l'incidence de *Staphylococcus aureus* dans le lait de tank sont donc particulièrement importantes dans les fermes où le lait est utilisé pour la fabrication de produits au lait cru.

1.1.3. Aspects réglementaires

La réglementation est issue des conséquences que pourraient avoir les mammites sur la santé publique. Le texte européen actuel qui concerne les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires est le règlement N° 2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005. Ce texte est paru au Journal Officiel de l'Union Européenne du 22 décembre 2005 (L 338/1). Il correspond au nouveau « paquet hygiène » établi au niveau européen et se base notamment sur les faits suivants :

- « les risques microbiologiques liés aux denrées alimentaires constituent une source majeure de maladies d'origine alimentaire chez l'homme »,
- « les denrées alimentaires ne doivent pas contenir de micro-organismes ni leurs toxines ou métabolites dans des quantités qui représentent un risque inacceptable pour la santé humaine »,
- « les exploitants du secteur alimentaire sont tenus de retirer du marché les denrées alimentaires dangereuses, (...) il convient de définir des critères de sécurité harmonisés relatifs à l'acceptabilité des denrées alimentaires, notamment en ce qui concerne la présence de certains micro-organismes pathogènes. »
- « la sécurité des denrées alimentaires est principalement assurée par une approche préventive (bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication, application des principes HACCP c'est-à-dire analyse des risques - points critiques pour leur maîtrise) » (règlement N° 2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005, Journal Officiel de l'Union Européenne du 22 décembre 2005 (L 338/1)).

Dans son chapitre 2.2, ce texte s'intéresse au lait et produits laitiers. Les principaux types de germes recherchés sont les *Enterobacteriaceae*, parfois plus précisément *Escherichia coli* seul, et les staphylocoques à coagulase positive, groupe auquel appartient *Staphylococcus aureus*, principal agent de mammites cliniques chez les brebis, et second agent de mammites subcliniques, après les staphylocoques à coagulase négative (voir 1.2-).

Les staphylocoques à coagulase positive sont recherchés dans certains types de fromages : les fromages au lait cru, les fromages à base de lait ayant subi un traitement thermique moins fort que la pasteurisation, les fromages affinés à base de lait ou de lactosérum pasteurisés ou ayant subi un traitement thermique plus fort que la pasteurisation, et enfin les fromages à pâte molle non affinés (fromages frais) à base de lait ou de lactosérum pasteurisés ou ayant subi un traitement thermique plus fort que la pasteurisation. Ces bactéries sont aussi recherchées dans le lait en poudre et le lactosérum en poudre.

Le texte précise le nombre n d'échantillons devant être analysés, et le nombre c maximal de résultats pouvant présenter des valeurs comprises entre deux valeurs seuils. La qualité du produit est insatisfaisante lorsqu'une ou plusieurs valeurs observées sont supérieures au seuil supérieur ou lorsque plus de c/n valeurs se situent entre les deux seuils. Le texte définit les actions à entreprendre en cas de résultats insatisfaisants, à savoir le plus souvent une amélioration de l'hygiène de la production et de la sélection des matières premières, et une

recherche des entérotoxines staphylococciques lorsque le seuil de 10^5 UFC/gramma est dépassé.

1.2 - Etiologie et épidémiologie des mammites ovines (Bergonier *et al.*, 2003 a)

Nous ne traiterons que des brebis dans cet exposé. Les infections mammaires ovines et caprines ont de nombreux points communs mais se différencient par quelques aspects physiopathologiques. Chez les chèvres, il y a une période sèche plus courte (voire absente), les facteurs de variation des comptages cellulaires sont plus variés, les chèvres ont une plus grande susceptibilité au stress, et elles peuvent être victimes d'infections lentivirales... Le mode de sécrétion du lait est apocrine chez la chèvre, alors qu'il est mérocrine chez la brebis. Enfin, les méthodes distinctes employées en élevages caprins et ovins contribuent également à ces différences dans l'épidémiologie des mammites.

1.2.1. Mammites cliniques

Un examen attentif des caractéristiques macroscopiques de la sécrétion mammaire, une inspection et une palpation de la mamelle et des nœuds lymphatiques rétro-mammaires (souvent négligés) permettent de diagnostiquer et de caractériser les différentes formes de mammites cliniques.

Les cas sporadiques de mammites cliniques sont principalement dus à *Staphylococcus aureus*. En seconde position, on note l'importance des Staphylocoques Coagulase Négatifs (SCN), qui, contrairement à ce qui est observé chez les bovins, ne peuvent pas être considérés systématiquement comme des pathogènes mineurs chez les petits ruminants : les plus fréquents sont *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosus* et *S. epidermidis* (Bergonier, 2005). Puis, par ordre de prévalence décroissant, viennent les Streptocoques, les *Pasteurellaceae*, les Entérobactéries, *Arcanobacterium pyogenes*, les Corynebactéries, , *Pseudomonas spp*, etc...

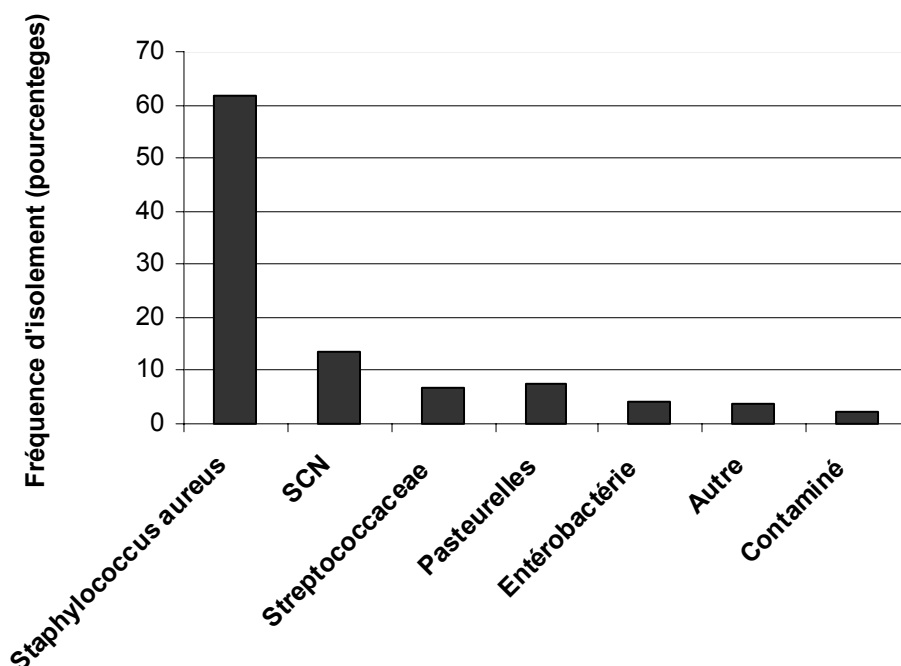


Figure 1 : Fréquences d'isolement des bactéries à l'origine de mammites sporadiques aiguës ou suraiguës dans le rayon de Roquefort et dans les Pyrénées-Atlantiques (Bergonier, 2005)

Les épidémies enzootiques ou épizootiques de mammites cliniques sont le plus souvent dues à *Staphylococcus aureus*. Les Staphylocoques à Coagulase Négative (SCN) représentent ensuite le groupe le plus prévalent, avec les quatre mêmes espèces majeures, *S. epidermidis* étant la plus prévalente (Bergonier, 2005). Puis viennent *Streptococcus suis* (surtout en période de lactation), *Aerococcus viridans* et *Enterococcus faecalis*. Lors de mammites cliniques épizootiques ou enzootiques, on met aussi parfois en évidence l'existence d'un agent étiologique principal non staphylococcique, parfois quasi-unique : il s'agit de pathogènes opportunistes tels que *Aspergillus fumigatus* et *Pseudomonas aeruginosa* (en peri-partum et parfois au tarissement).

L'incidence des mammites cliniques est en général inférieure à 5% par an, donc faible par rapport à la situation en filière bovine où l'on diagnostique près de 30% de mammites cliniques par an (Barillet *et al.*, 1999).

Cependant, *Staphylococcus aureus*, les Streptocoques ou les pathogènes opportunistes peuvent provoquer dans un faible pourcentage de troupeaux des épidémies touchant 30 à 50% des brebis (Bergonier *et al.*, revue d'articles, 2003 a). Le taux de persistance, bien que peu étudié, est élevé. En effet, les brebis à mammites (en particulier mammites subaiguës) ne sont

pas toujours réformées immédiatement ; des cas aigus peuvent virer au chronique et durer plusieurs mois voire plus. La réforme pour cause d'infection intra-mammaire atteint 7% des causes totales de réforme (Lagriffoul, résultats non publiés, cité dans Bergonier *et al.*, 2003 a).

1.2.2. Mammites subcliniques

Les SCN sont les pathogènes les plus prévalents : ils sont mis en évidence dans 25 à 93% des cas selon les études (valeur moyenne de 78%). Il s'agit de *S. epidermidis*, puis *S. xylosus*, *S. chromogenes* et *S. simulans*. *S. epidermidis* est généralement associé aux valeurs moyennes de CCS les plus élevées. Au sein de ce groupe des SCN, 60 à 80% des souches sont hémolytiques et associées à des comptages cellulaires moyens significativement plus élevés que ceux liés aux souches non hémolytiques (Bergonier, 2005). *S. aureus* vient ensuite (3 à 37% des cas) : ce pathogène est principalement isolé à partir d'infections devenues chroniques (moins sévères). La production de leucotoxines est plus faible, voire absente, lors d'une infection par des SCN, comparée à une infection par *S. aureus*.

Enfin, exceptionnellement, des mammites subcliniques à chroniques peuvent être causées par *Listeria monocytogenes*, divers sérotypes de salmonelles et *Escherichia coli*.

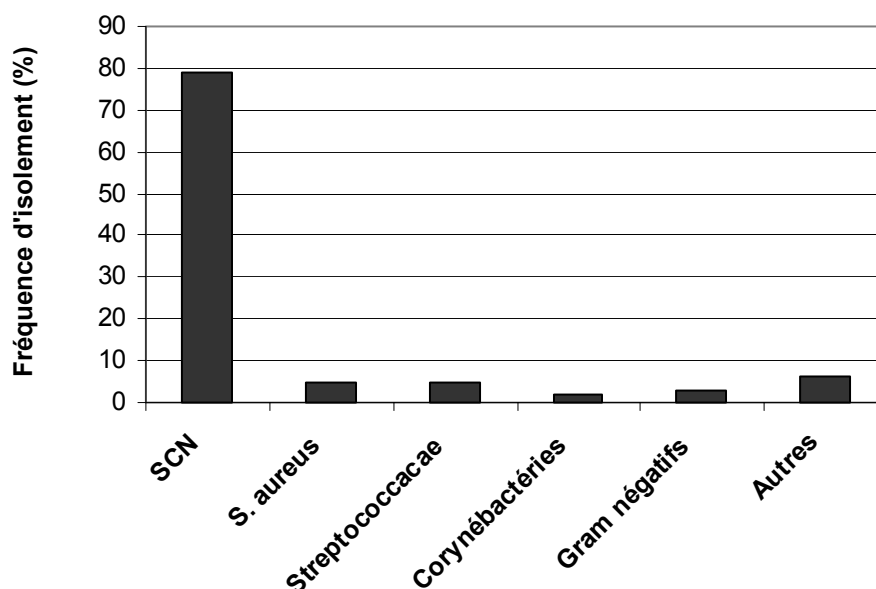


Figure 2 : Etiologie des mammites subcliniques des brebis laitières (Bergonier, 2006)

Comme chez les bovins laitiers, la prévalence peut être estimée par les CCS de tank : cela permet d'évaluer le statut d'infection mammaire moyen du troupeau. Dans beaucoup de régions, ces CCS tank sont mesurés dans chaque troupeau une fois par mois. Chez les brebis, le CCS tank moyen annuel est fortement lié à la proportion de brebis présumées infectées persistantes (Bergonier *et al.*, 2003 b). Une augmentation de 100 000 cellules par mL a été associée avec une augmentation de la prévalence estimée de 2,5% environ (Lagriffoul *et al.*, 1999).

La persistance d'une infection subclinique est variable selon l'agent pathogène en cause mais généralement élevée, puisque les infections à Staphylocoques sont les plus fréquentes. Les infections subcliniques sont en général assez peu détectées et ne sont pas éliminées, du moins pendant la lactation. Dans les troupeaux français inscrits au contrôle laitier officiel (379 troupeaux du rayon Roquefort), la palpation de la mamelle et la réalisation d'un CMT (Californian Mastitis Test) sont réalisés seulement occasionnellement par respectivement 57 et 65% des éleveurs, et ces chiffres sont élevés en comparaison d'autres régions d'élevage.

Concernant l'épidémiologie analytique des mammites à *S. aureus*, les bactéries ont pour sources primaires le portage par l'animal et les infections subcliniques. Le réservoir principal de Staphylocoques est constitué par les infections subcliniques ainsi que par les infections cutanées des trayons (traumatisme, surinfection suite de l'ecthyma contagieux) (Bergonier *et al.*, 2003). Les sources accessoires de Staphylocoques sont le logement, le lieu de couchage, l'aliment, l'air, les insectes, les équipements, les mains de l'éleveur, les autres animaux (Albenzio *et al.*, 2003). Au contraire, les Entérobactéries et Entérocoques se trouvent surtout dans la litière. Des densités animales élevées, en particulier lors de la période d'allaitement ou dans les troupeaux conduits de manière intensive, peuvent se traduire par une importante concentration aérienne en microorganismes totaux, en bactéries mésophiles ou coliformes, et en staphylocoques (Sevi *et al.*, 1999). Ces concentrations élevées sont souvent associées à une ventilation insuffisante et une humidité relative élevée (Sevi *et al.*, 2001). La transmission s'effectue principalement lors de la traite. Elle peut aussi être liée aux agneaux « voleurs de lait » (portage buccal et naso-pharyngé), en particulier dans le cas des Staphylocoques. La pénétration dans la mamelle se fait ensuite via le canal du trayon.

1.3 - Les comptages cellulaires et leur importance dans la gestion des mammites

On parle de cellules somatiques dans le lait par opposition aux bactéries trouvées lors d'infection. Dans le lait bactériologiquement négatif, on trouve les cellules suivantes : principalement des macrophages (45-85%), des polynucléaires neutrophiles (10-35%) des lymphocytes (10-17%) et moins de 5% d'épithéliocytes, cellules dérivées des conduits et sinus du lait (Bergonier *et al.*, 2003). Lors de processus inflammatoire de la mamelle, les cellules somatiques restent les mêmes mais dans des proportions différentes. Les comptages de ces cellules peuvent être réalisés pour chaque brebis (CCS individuel) ou au niveau du troupeau (CCS de tank).

1.3.1. CCS individuels

La valeur moyenne du CCS individuel pour des mamelles non infectées de brebis en milieu de lactation s'étale entre 100 000 et 250 000 cellules par mL. Les principaux facteurs de variation du CCS pour une mamelle saine sont, par ordre décroissant de fréquence : le stade de lactation, l'âge ou le rang de lactation, les variations journalières (traite du matin - traite du soir), les fractions de lait à la traite et le potentiel laitier de la brebis (Lagriffoul *et al.*, 1996 b). Par exemple, c'est durant les premières semaines de lactation que les comptages sont les plus élevés, ils diminuent ensuite au moment du pic de production.

A partir de 42 685 échantillons de 8712 lactations de brebis laitières de races Basco-Béarnaises, Lacaune ou Manech, dans 23 troupeaux, l'étude réalisée par Lagriffoul *et al.*, (1996 b) décrit la dispersion des CCS et analyse l'influence de certains facteurs de variation systématique des CCS. La répétabilité des CCS est estimée au cours de la lactation à la traite du matin, ou entre la traite du matin et celle du soir.

L'effet du stade de lactation est hautement significatif. Au domaine INRA de La Fage, les CCS mesurés durant la phase d'allaitement (ou d'allaitement-traite), soit 20 jours après la mise-bas, sont supérieurs à ceux mesurés en début de traite exclusive après le sevrage des agneaux. Après le sevrage des agneaux, les CCS diminuent jusqu'au 45^{ème} au 65^{ème} jour de lactation (selon le numéro de lactation) ; puis, les CCS restent relativement stables (du 65^{ème}

au 105^{ème} jour de lactation), aux valeurs les plus basses, enfin, ils augmentent, plus ou moins régulièrement, du 105^{ème} au 225^{ème} jour.

Le numéro de lactation chez les brebis a également un effet hautement significatif, conformément aux résultats disponibles dans l'espèce bovine. Les CCS augmentent avec la parité des brebis (augmentation moyenne de 20 000 cellules par numéro de lactation). Le nombre d'agneaux nés (assimilable généralement au nombre d'agneaux allaités) se traduit par des CCS significativement plus élevés pour les brebis ayant allaité au moins deux agneaux par rapport aux brebis n'en ayant allaité qu'un. Enfin, les CCS mesurés à la traite du soir sont plus élevés d'environ 10% en échelle logarithmique que ceux mesurés à la traite du matin.

Les CCS du lait constituent un marqueur de l'état sanitaire de la mamelle. En effet, une inflammation de la mamelle se traduit par un afflux de leucocytes et donc une augmentation du nombre de cellules somatiques. On recommande l'utilisation d'au minimum deux valeurs consécutives de CCS individuels par lactation et la définition de deux seuils en utilisant la même méthode de détection, afin de classer les brebis en « saines », « douteuses » ou « infectées ».

La répétabilité des CCS, au cours de la lactation, n'est pas suffisante pour statuer sur l'état sanitaire des brebis à partir d'un seul CCS. Les CCS de début et milieu de lactation sont nettement plus répétables que ceux de fin de lactation (Lagriffoul *et al.*, 1996 b). Les auteurs se demandent alors si l'on peut pour autant en déduire qu'il serait possible de réduire les mesures systématiques de CCS au début et milieu de lactation, dans l'optique de simplifier les contrôles dans l'espèce ovine...

1.3.2. CCS de tank

La maîtrise du niveau de cellules somatiques dans le lait constitue un enjeu majeur, tant du point de vue des éleveurs que des transformateurs (aptitude fromagère, qualité hygiénique du lait). En conséquence, un suivi généralisé des CCS du lait de brebis collecté est réalisé dans le Rayon de Roquefort et les Pyrénées-Atlantiques depuis 1990 (Lagriffoul *et al.*, 1996 a). Des prélèvements du lait de mélange de chaque troupeau sont effectués 2 ou 3 fois par mois dans le cadre du paiement du lait en fonction de la qualité hygiénique ou de la composition physico-chimique du lait. Les échantillons sont conservés à 1-2°C et envoyés dans un des Laboratoires Interprofessionnels d'Analyses Laitières (LIAL), situés à Auch (CIAL SO d'Auch) ou Aurillac (LIAL MC d'Aurillac) pour le Sud-ouest, où ils sont analysés

dans les 24 heures qui suivent le prélèvement. Les CCS y sont mesurés avec la méthode **opto-fluoro-électronique**, à l'aide de compteurs de type Fossomatic ou Somacount.

Dans la deuxième étude de Lagriffoul *et al.* (1996 b), les résultats de répétabilité des CCS sont discutés, du point de vue pratique, en relation avec les CCS de tank qui étaient égaux en moyenne à 600 000 cellules par mL (moyenne sur 23 élevages). A chaque contrôle, des prélèvements de lait de tank ont été effectués (lait du soir seul et lait de mélange des deux traites journalières), de sorte que 153 contrôles-troupeaux étaient disponibles. Les plus gros élevages (à forte livraison) avaient en moyenne des CCT plus faibles.

Pour les 23 élevages étudiés dont le CCT moyen est égal à 600 000 cellules par mL, le pourcentage de brebis présentant au moins 3 CCS supérieurs à 700 000 cellules par mL est relativement réduit, soit 11% du cheptel.

Pour les élevages à CCT annuels supérieurs à 400 000 cellules par mL (avec un extrême de 1 758 000 cellules par mL), 10 à 25% des brebis présentent au moins 3 CCS supérieurs à 700 000 cellules par mL. L'élimination de ces brebis pourrait permettre d'espérer une diminution très significative du CCT. Mais il est difficile de détecter les mammites subcliniques à partir des CCS, étant donné que dans l'espèce ovine, le contrôle laitier qualitatif mensuel (avec prise d'échantillons) n'existe pas de manière très répandue.

1.3.3. Applications opérationnelles

Un programme de recherche et développement a été mis en place, au sein du Comité National Brebis Laitière, afin d'acquérir des connaissances permettant, d'une part de contrôler efficacement le niveau de cellules somatiques du lait des populations ovines laitières, d'autre part d'apprécier son incidence technologique (Lagriffoul *et al.*, 1996 a). L'objectif est de proposer des outils et méthodes d'approche permettant de définir la fréquence, les périodes et les méthodes de contrôle au niveau du troupeau et de la brebis, en fonction du statut de l'élevage, qui peut être apprécié par le suivi du lait produit par chaque producteur.

Les premiers résultats de cette étude montrent, d'une part, que la proportion de brebis présentant des taux cellulaires élevés à plusieurs contrôles mensuels successifs est relativement limitée, d'autre part que l'élimination de ces brebis aurait un impact important sur le taux cellulaire du lait de mélange.

La difficulté est de définir les modalités permettant la détection des mammites subcliniques (par l'intermédiaire des CCS) dans une espèce pour laquelle le contrôle laitier

qualitatif (prise d'échantillon), quand il existe, est simplifié et ne concerne qu'une fraction utile à des fins de sélection de brebis du noyau de sélection. Pour cela, il est difficile de s'appuyer sur les connaissances acquises dans la filière bovine. En effet, la gestion sanitaire des mamelles, en élevage bovin laitier, est fondée sur la cinétique des CCS individuels réalisés mensuellement dans le cadre du contrôle laitier (ou grâce au CMT dans les élevages hors contrôle laitier). A l'inverse, en ovins laitiers, les modalités de détection (CCS individuels, CMT, palpation des mamelles...) ainsi que les mesures d'élimination des infections mammaires subcliniques (traitements hors lactation, réforme...) devront probablement être modulées selon le niveau moyen de cellules somatiques du lait de chaque troupeau (CCS de tank).

En termes opérationnels, un dépistage en début de lactation viserait plutôt à réformer des brebis pour diminuer la pression d'infection et les comptages cellulaires de tank, alors qu'au tarissement des brebis, l'objectif pourrait aussi être curatif. En tout état de cause, les CCS sont soumis à des facteurs de variation systématiques (stade et numéro de lactation, etc...) dont il faudrait probablement tenir compte si on utilisait les CCS à des fins de dépistage des mammites subcliniques. D'autres particularités de l'espèce ovine devront être considérées, si on veut fonder le diagnostic des mammites subcliniques sur les CCS : saisonnalité, période sèche de 2 à 4 mois, prédominance des staphylocoques coagulase négative...

Il est probable que l'on peut d'autant plus réduire le nombre de CCS pour détecter les mammites subcliniques que le CCT du troupeau est élevé. En effet, la prévalence des infections augmente avec le CCT, de sorte que la détection des brebis à infection est certainement plus facile. Il importe cependant de valider cette hypothèse.

En filière bovine laitière, l'amélioration génétique du potentiel laitier se traduit par une susceptibilité plus forte aux mammites (Le Bihan, 1992). Il serait important de vérifier si l'on observe une telle tendance chez les ovins laitiers, particulièrement pour les populations soumises à une sélection laitière efficace.

1.4– Intégration des comptages cellulaires dans le schéma de sélection **ovin lait**

1.4.1. Paramètres génétiques des CCS

De manière générale, la sélection animale exploite la part de variabilité génétique additive intra-population (c'est-à-dire dans une même race). L'héritabilité est la part de variation des performances due à des différences de valeurs génétiques additives entre animaux. Par exemple, si l'héritabilité d'un caractère est forte, c'est que l'essentiel des variations observées est dû à des variations génétiques et non à des variations du milieu. Pour un programme de sélection, il faut impérativement estimer les corrélations génétiques entre les caractères économiquement importants, par exemple dans le cas étudié ici, la production de lait, la composition du lait, des caractères phénotypiques et les comptages cellulaires. La corrélation génétique entre deux caractères est la corrélation entre les valeurs génétiques pour deux caractères étudiés. Elle est favorable quand la valeur la plus élevée pour l'un des critères correspond aussi à la valeur la plus élevée pour l'autre.

La sélection est assistée par des marqueurs placés sur des cartes du génôme. Cela permet de mieux choisir les reproducteurs et de mieux estimer les valeurs génétiques. Il existe des gènes à effet suffisamment fort pour pouvoir les utiliser dans un but de sélection : il s'agit des QTL (Quantitative Trait Loci), qui sont des gènes à effet significatif sur des caractères quantitatifs : un QTL explique une part significative de la variabilité intra-race observée. On se sert des génotypes avec les marqueurs pour identifier les zones du génôme avec un QTL entre deux marqueurs (on obtient un génotype aux QTL).

Les bases génétiques de la susceptibilité aux infections intra-mammaires ont été établies : l'héritabilité est modérée (valeur variable selon les études et leurs conditions) et il existe des QTL associés aux CCS. Ils sont situés chez les bovins laitiers sur les chromosomes 1, 3, 7, 8, 18, 21 et 23 pour les CCS, et sur le chromosome 14 pour ce qui est des mammites cliniques (Rupp *et al.*, 2003).

Les CCS sont souvent, après une transformation logarithmique, représentés par le SCS (Somatic Cell Score) : $SCS = \log_2(CCS/100\ 000) + 3$ où CCS est le nombre de cellules somatiques par mL.

Chez les bovins, la corrélation génétique entre les SCS et l'infection bactérienne a été estimée proche de 1 (Weller *et al.*, 1992). Cette corrélation est favorable : pour des valeurs élevées de SCS, on aura des infections subcliniques nombreuses, et inversement. La corrélation génétique correspondante avec les mammites cliniques était au contraire plutôt basse, proche de 0,3. Cependant, ce résultat est à moduler : la plupart des estimations de corrélations génétiques entre CCS et mammites cliniques, issues de données scandinaves, s'étalent de 0,50 à 0,80, avec une moyenne de 0,70 (Rupp *et al.*, 2003). Cette valeur relativement élevée suggère que les SCS et les cas cliniques sont partiellement l'expression du même caractère qui implique des gènes communs, malgré une corrélation phénotypique faible (0,3). En effet, quand on utilise les CCS mensuels, on ne détecte que 30% des mammites cliniques, du fait de la durée de celles-ci et du nombre de pathogènes pouvant être impliqués.

Une sélection directe contre les mammites cliniques est difficile chez les bovins (Rupp *et al.*, 2003), parce que dans la plupart des pays, leur enregistrement n'est pas largement répandu (ou est imprécis), elles sont sous-déclarées. L'héritabilité faible des mammites cliniques joue aussi en défaveur de cette sélection. Cependant, beaucoup d'arguments sont en faveur d'une sélection sur le caractère « résistance aux mammites » à partir du critère CCS. D'une part, les CCS sont largement enregistrés dans le cadre des contrôles laitiers bovins. Ensuite, l'héritabilité des CCS est plus grande que celle des mammites cliniques. Enfin, la corrélation génétique entre ces deux caractères est moyenne à élevée. C'est pourquoi il a été pensé qu'une sélection pour des CCS diminués pourrait réduire la susceptibilité aux mammites cliniques et subcliniques. Cependant, alors que la sélection d'animaux avec des CCS bas réduirait l'incidence des mammites, la question se pose de savoir si les CCS devraient être réduits jusqu'à la valeur la plus basse possible ou s'ils devraient ne pas être abaissés au-dessous d'un certain seuil. Certains auteurs craignent en effet qu'une forte réduction des CCS puisse atteindre la capacité de la vache à recruter des leucocytes et, ainsi, sa capacité à répondre à une infection intra-mammaire (Kehrli, 1994).

Certains auteurs ont également observé que des quartiers avec des CCS moyens à élevés initialement (300 000 ou 400 à 700 000 cellules par mL respectivement) avaient un risque plus faible d'être infectés s'ils étaient inoculés expérimentalement par des agents pathogènes de mammites. Enfin, il a été montré suite à des enquêtes chez les bovins que les CCS de tank les plus bas étaient associés de manière significative aux fréquences de mammites les plus élevées. Le meilleur moyen d'éviter les conséquences indésirables d'une sélection uniquement basée sur les CCS serait d'utiliser les mammites cliniques comme un critère supplémentaire de résistance, comme cela est déjà fait actuellement dans certains pays

nordiques (Danemark, Finlande, Suède). Si l'enregistrement des mammites cliniques n'est pas réalisé, les éleveurs devraient au moins être encouragés à garder disponible des enregistrements des événements cliniques, des réformes ou des traitements.

Chez les ovins maintenant, la plupart des études menées à large échelle (races Churra et Lacaune) montrent une héritabilité comprise entre 0,11 et 0,15 pour le SCS moyen sur une lactation. Une haute corrélation génétique entre la première et la deuxième lactation (0,88-0,93) a été démontrée, indiquant que les mêmes gènes déterminant le SCS interviennent probablement à travers les lactations. La variabilité génétique du SCS chez les brebis laitières apparaît donc suffisante pour permettre une sélection des animaux sur ce critère.

En ce qui concerne la relation entre la santé de la mamelle et les caractères de production laitière, plusieurs études montrent une corrélation génétique positive défavorable entre les SCS et les caractères de production (entre 0,1 et 0,2), comme c'est le cas en élevage laitier bovin.

Une analyse génétique préliminaire a été menée par Barillet *et al.* (1999). Elle utilise, d'une part, les données collectées entre 1992 et 1997 au domaine INRA de La Fage et, d'autre part, les enregistrements de CCS accumulés depuis 1993 dans certains des troupeaux Lacaune appartenant au contrôle laitier officiel. Cette étude se restreint aux brebis en première lactation : celles-ci sont informatives puisque les mamelles peuvent être considérées comme non infectées avant le premier agnelage. Une analyse génétique de la résistance aux mammites a donc été menée sur 957 brebis Lacaune en première lactation du troupeau expérimental de l'INRA, et sur 3 811 agnelles issues de 38 troupeaux. Les brebis du troupeau expérimental appartenaient à deux lignées divergentes (Haute et Basse) pour la production laitière, sélectionnées depuis 1989. Les brebis de la lignée haute produisaient 25% de lait en plus que celles de la lignée basse. Cela correspond à une déviation génétique de 1,7, soit une différence d'environ 60 litres de lait par lactation.

La moyenne arithmétique des CCS était de 375 000 cellules par mL. La fréquence des mammites cliniques était de 5%, inférieure à l'incidence des mammites subcliniques estimée à 10%. Ces mammites cliniques n'étaient pas génétiquement liées à la production de lait, contrairement aux mammites subcliniques. Ainsi, à l'heure de cette étude, la sélection pour la résistance aux mammites semblait pouvoir se limiter à la résistance vis-à-vis des mammites subcliniques en se basant sur le critère du Score Cellulaire Somatique.

Les estimations d'héritabilité pour les mesures quotidiennes de CCS (0,02 à 0,15) étaient nettement plus basses que celles pour les CCS moyens sur une lactation (0,15 à 0,18)

et augmentaient avec le jour de lactation en relation avec l'augmentation du nombre de brebis infectées. Ce résultat suggère que le modèle usuel quotidien versus le modèle « moyenne sur une lactation » n'est pas suffisant pour améliorer substantiellement la précision de l'évaluation génétique des CCS, puisque l'objectif est en réalité de rendre compte des mammites subcliniques.

Pour les mammites subcliniques, contrairement aux mammites cliniques, il y avait une augmentation significative des brebis « infectées » pour la lignée haute par rapport à la lignée basse, montrant un antagonisme génétique entre la production de lait et la résistance aux mammites subcliniques. Le risque pour une brebis d'être supposée sub-cliniquement infectée est significativement augmenté chez les lignées hautes sélectionnées sur leur production laitière dans l'élevage expérimental de La Fage (Lagriffoul *et al.*, 1996 b).

L'antagonisme génétique entre la production laitière et les SCS est faible en comparaison de celui qui existe entre la production laitière et la composition du lait (taux butyreux et protéiques). En conséquence, il semble réalisable de sélectionner des béliers à la fois pour une augmentation de la production laitière et une réduction des SCS.

D'un point de vue génétique, la sélection pour la résistance aux mammites pourrait sembler plus facile à mettre en place chez les brebis que chez les vaches, puisque pour le moment elle pourrait se réduire à une sélection vis-à-vis des mammites subcliniques. Un tel but implique de mesurer les SCS (au moins en première lactation), ce qui en pratique est moins difficile que la collecte dans les fermes de données individuelles sur les causes de réforme incluant les mammites cliniques.

Il faut se rappeler que les premières lactations sont très informatives du point de vue génétique du fait que les mamelles des agnelles ne sont pas infectées avant le premier agnelage. Les présents résultats suggèrent donc qu'une amélioration notable dans la précision de l'évaluation génétique des SCS devrait passer non seulement par le remplacement d'un modèle en lactation par un modèle quotidien, mais aussi par la capacité à prendre en compte le fait que le SCS est un caractère temps – dépendant reflétant le statut infectieux de la mamelle (Barillet *et al.*, 1999).

1.4.2. Inclusion des CCS dans le schéma de sélection Lacaune lait

La race de brebis Lacaune dans le rayon de Roquefort est actuellement sélectionnée sur la production de lait, la composition du lait (taux butyrique et protéique), des caractères phénotypiques, et depuis moins longtemps, sur les comptages cellulaires et des critères morphologiques mammaires. Un nouvel index est utilisé depuis 2006 qui prend en compte à 50% les caractères laitiers et à 50% les caractères fonctionnels (SCS et morphologie mammaire). Comme nous l'avons dit précédemment, la maîtrise du niveau de cellules somatiques dans le lait constitue un enjeu majeur, du point de vue des éleveurs et des transformateurs (aptitude fromagère, qualité hygiénique du lait). Les CCS du lait de brebis collecté sont suivis de manière généralisée dans le Rayon de Roquefort et les Pyrénées-Atlantiques depuis 1990 (Lagriffoul *et al.*, 1996 a). Des prélèvements de lait de mélange de chaque troupeau sont réalisés 2 ou 3 fois par mois dans le cadre du système de paiement du lait en fonction de la qualité hygiénique ou composition physico-chimique du lait.

Depuis 2002, la résistance aux mammites est incluse dans le schéma de sélection de la race Lacaune, en se basant sur les comptages cellulaires. L'héritabilité de la moyenne pondérée des SCS par lactation (ajustés pour le stade de lactation) est proche de 0,13 et comparable en lactation 1 et 2, avec une corrélation génétique élevée entre lactations (Rupp *et al.*, 2003). Les index des béliers pour ce critère SCS par lactation sont diffusés depuis le printemps 2002. Ainsi, les éleveurs peuvent choisir leurs béliers reproducteurs sur le critère de la résistance présumée aux mammites, en plus des critères existant jusqu'alors. Toutefois, une amélioration de la résistance aux mammites basée sur la sélection est un processus à long terme et seulement en partie efficace. Il reste donc nécessaire de maintenir en parallèle des mesures sanitaires appropriées.

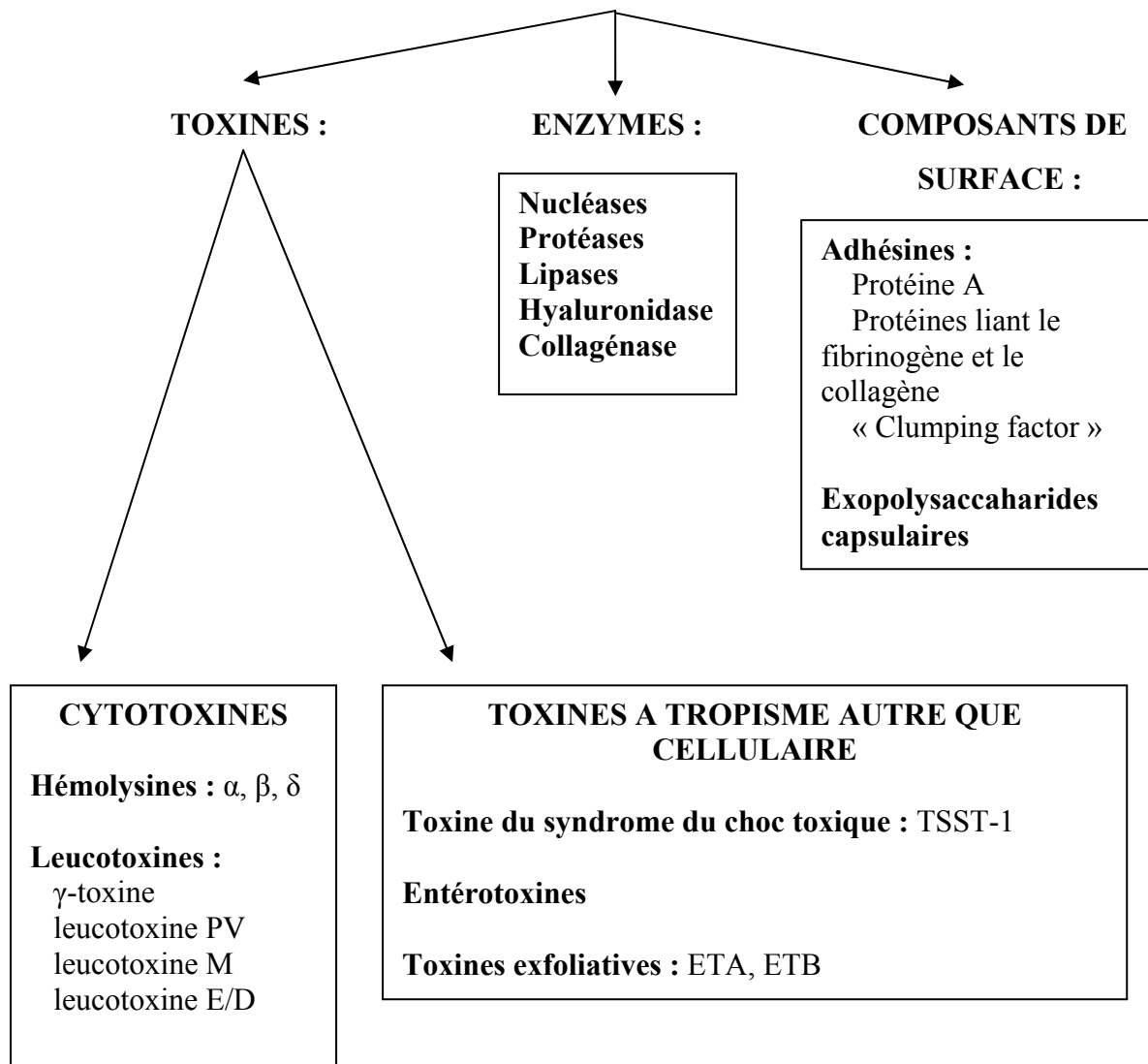
2- Caractérisation bactériologique de *Staphylococcus aureus*

Afin de comprendre les tableaux cliniques, lésionnel, bactériologique et cellulaire observés lors d'infection à *Staphylococcus aureus*, il est indispensable de s'intéresser à cette bactérie d'un point de vue moléculaire. Les staphylocoques, de la famille des *Micrococcaceae*, fabriquent des produits de structure, enzymatiques et toxiques, variés qui sont associés à des capacités d'adhérence, d'invasion, de toxicité et d'évitement des mécanismes de défense de l'hôte (Mitchell *et al.*, 1986).

Introduction : facteurs responsables du pouvoir pathogène de *Staphylococcus aureus*

Pratiquement toutes les souches de *Staphylococcus aureus* produisent des enzymes et des cytotoxines qui permettent en particulier de convertir les tissus locaux de l'hôte en nutriments nécessaires à la croissance bactérienne : il s'agit d'hémolysines, de nucléases, de protéases permettant une pénétration des tissus et une adhésion sélective, mais aussi de lipases, de hyaluronidases et de collagénases. Certaines souches produisent une ou plusieurs toxines supplémentaires : la toxine-1 du syndrome du choc toxique, des entérotoxines, des toxines exfoliatives, et une ou plusieurs leucotoxine(s) (Dinges *et al.*, 2000). Des composants de surface ont également un rôle dans la virulence de cette bactérie : adhésines, protéine A et polysaccharides capsulaires.

Facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* (non exhaustifs) :



2.1 - Les toxines

2.1.1. Les cytotoxines

Il s'agit de toxines à activité membranaire.

2.1.1.1. L' α -hémolysine

L' α -hémolysine, ou α -toxine, est toxique vis-à-vis de nombreux types de cellules de mammifères. Elle est dermonécrotique et neurotoxique. Elle est particulièrement active sur les érythrocytes de lapin (Dinges *et al.*, 2000) : ces cellules sont au moins cent fois plus sensibles que celles des autres mammifères, et mille fois plus sensibles que celles de l'homme.

Les effets sur l'hôte sont largement dus à la formation de pores dans la membrane permettant un passage d'ions à travers celle-ci, et provoquant donc une altération de l'équilibre des ions chez l'hôte. Des monomères d' α -hémolysine sont sécrétés par *S. aureus* et intégrés dans la membrane de la cellule cible où ils forment un heptamère cylindrique (Gouaux, 1998). C'est cette forme oligomérique qui est capable de lyser les cellules eucaryotes. Une fois l'heptamère cylindrique formé dans la membrane, un pore de 1 à 2 nm est formé. Toutefois, ces pores ne se forment pas sur tous les types cellulaires sensibles. Des pores plus petits, qui permettent seulement à des ions monovalents de passer, se forment notamment sur les lymphocytes (Jonas *et al.*, 1994). Certaines cellules (les fibroblastes en particulier) sont capables de réparer les dommages causés à la membrane par de faibles doses d' α -toxine. Des facteurs environnementaux influent sur la production de cette toxine (Ohlsen *et al.*, 1997) : l'expression de certains gènes dépend notamment de la température, avec une expression maximale à 42°C.

Un exemple de ce mécanisme d'action est la formation de pores sur les membranes des cellules endothéliales : elle conduit à la mise en route du métabolisme de l'acide arachidonique, du fait d'un influx d'ion Ca^{2+} (Seeger *et al.*, 1990 ; Suttorp *et al.*, 1985). La formation de thromboxane et de prostacycline conduit à l'activation de cette voie métabolique et à une vasoconstriction. Les modifications d'osmolarité provoquent de plus un gonflement des cellules et une rupture de l'intégrité cellulaire, ce qui a pour effet d'augmenter la

perméabilité vasculaire. L'effet final sur l'hôte est un œdème pulmonaire ou un syndrome de détresse respiratoire.

La neurotoxicité de l'alpha-toxine a été observée chez les lapins et les souris : elle est liée à une destruction des gaines de myéline entourant les nerfs des lapins et celles du cortex cérébral des souris (Bhakdi *et al.*, 1991).

2.1.1.2. La β -hémolysine

La bêta-hémolysine, ou sphingomyélinase C altère les membranes riches en lipides. Elle est produite en grande quantité par de nombreuses souches de *S. aureus*. Glenny et Stevens (Glenny *et al.*, 1935), qui l'ont identifiée en 1935, ont montré qu'elle était hautement hémolytique pour les érythrocytes de mouton mais pas de lapin, et qu'elle était dermonécrotique chez le cochon d'Inde mais pas létale pour la souris. En 1963, on a montré que cette toxine avait une activité de phosphorylase c (Doery *et al.*, 1963).

Le rôle de la bêta-hémolysine dans les maladies causées par *S. aureus* n'est pas encore clairement compris. Elle possède un haut niveau d'expression chez les souches animales.

Les α - et β -hémolysines peuvent aussi causer une inflammation importante quand elles sont injectées toutes seules, même sans les bactéries.

2.1.1.2. La δ -hémolysine

La delta-hémolysine, aussi appelée delta-lysine ou delta-toxine, cause des dommages sur la membrane d'un certain nombre de cellules de mammifères. Elle a une activité hémolytique ((Dhople *et al.*, 2005). Mais bien qu'elle ait de nombreux effets cytotoxiques, son importance dans l'étiologie des maladies liées à *S. aureus* reste assez peu claire. Elle peut lyser les érythrocytes, et une activité dermonécrotique a été observée (Freer *et al.*, 1982). Elle provoque la mort d'animaux d'expérimentation lorsqu'elle leur est injectée en concentrations élevées. Mais il est aussi possible que ces activités soient le résultat de contaminations par de très petites quantités d'alpha-toxine (Freer *et al.*, 1982).

Une hélice de type α est formée avec des domaines hydrophobes et hydrophiles (Freer, 1987). En se basant sur cette information, il a été proposé que la delta-hémolysine agit comme un surfactant et perturbe la membrane cellulaire.

2.1.1.3. Les leucotoxines (ou leucocidines)

Il s'agit d'exotoxines bactériennes qui ont la capacité de tuer spécifiquement les leucocytes, principalement les cellules phagocytiques telles que les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) et les monocytes (Rainard *et al.*, 2003). Chacune de ces toxines est faite de deux protéines sécrétées sous forme non associées, nommées composants S et F (pour « slow » et « fast » selon leur vitesse de migration) (Woodin, 1960). Les principales leucotoxines sont la γ -hémolysine (γ -toxine), la leucotoxine de Panton-Valentine (PV) qui correspond à l'association LukS-PV/LukF-PV, la leucotoxine LukE/D, et, plus récemment décrite la leucotoxine LukM (LukM/LukF'-PV).

La γ -hémolysine est une hémotoxine hémolytique et antibactérienne.

Les gènes codant pour la leucotoxine PV ont été clonés et séquencés par Prevost *et al.* (1995) et nommés *lukS*-PV et *lukF*-PV. Selon la manière dont s'associent les différents sous-types existant de protéines S et F, différentes combinaisons sont possibles, toutes capables de lyser efficacement les leucocytes (Konig *et al.*, 1997). Une réponse inflammatoire due à ces toxines a aussi été observée : la leucotoxine PV est capable d'induire une sécrétion de granules par les lymphocytes polymorphonucléaires et la libération de médiateurs de l'inflammation (Siqueira *et al.*, 1997).

Les leucotoxines induisent un influx d'ions Ca^{2+} , et, en conséquence, une formation de pores permettant l'entrée d'éthidium (Barrio *et al.*, 2006). Les souches de *S. aureus* responsables de mammites expriment au moins deux, et souvent trois leucotoxines. L'étude de Barrio *et al.* a montré que la paire homologue LukM/LukF'-PV est la plus active des leucotoxines. Les sous-unités composant les leucotoxines sont interchangeable dans chaque classe (S ou F) et leur association engendre des leucotoxines avec différentes activités spécifiques. LukM était aussi très active quand elle était associée avec les sous-unités F hétérologues. Pour ce qui est de la création d'influx d'ions Ca^{2+} , LukM/LukF'-PV était aussi la plus active, mais la γ -hémolysine est aussi très efficace. En supposant que l'entrée d'éthidium par la formation de pores reflète l'activité toxique sur les PMN bovins et l'influx

de Ca^{2+} l'activité cellulaire, LukM/LukF'-PV est apparue comme étant de loin la plus cytotoxique des leucotoxines, suivie de près par la γ -hémolysine en ce qui concerne l'activité des PMN.

2.1.2. Les toxines à tropisme autre que cellulaire

Il s'agit de la toxine 1 du syndrome du choc toxique (toxin shock syndrome toxin-1 ou TSST-1), des entérotoxines staphylococciques (SEA, SEB, SECn, SED, SEE, SEG, SEH, SEI...) et des toxines exfoliatives (ETA et ETB).

TSST-1 et les entérotoxines staphylococciques correspondent aux superantigènes des toxines pyrogènes (pyrogenic toxin superantigen ou PTSAgs). Comme la plupart des protéines sécrétées par *S. aureus*, elles sont produites lors de la phase de croissance post-exponentielle. Ces PTSAgs possèdent au moins trois propriétés biologiques : elles sont pyrogènes, ont des propriétés de superantigènes, elles peuvent multiplier le caractère létal des endotoxines jusqu'à 100 000 fois chez le lapin (Bohach *et al.*, 1990 ; Marrack *et al.*, 1990).

2.1.2.1. Les entérotoxines staphylococciques

Les entérotoxines staphylococciques sont de potentiels agents de gastroentérites suite à la consommation d'aliments contaminés (elles sont émétisantes, avec ou sans diarrhée). Elles sont stables à la chaleur. Ce sont des super antigènes puissants qui stimulent la prolifération non spécifique des cellules T (Balaban *et al.*, 2000).

Elles sont responsables de modifications histologiques. Des lésions de type inflammatoires sont observées dans différentes parties du tractus gastro-intestinal, les lésions les plus sévères apparaissant dans l'estomac et les parties hautes de l'intestin grêle. (Kent, 1966). Dans ces zones, la muqueuse est hyperhémisée et présente des neutrophiles infiltrés dans l'épithélium et la lamina propria sous-jacente. Un exsudat mucopurulent est présent dans la lumière du duodénum. Dans le jéjunum, les cryptes sont agrandies et la bordure en brosses est interrompue voir absente en certains endroits. Des infiltrats étendus de neutrophiles et de macrophages apparaissent également dans la lamina propria du jéjunum.

L'hypothèse la plus avancée pour expliquer les vomissements est que ceux-ci ont lieu en réponse à une inflammation induite par ces toxines. Les symptômes de cet empoisonnement sont fortement corrélés avec l'induction d'un certain nombre de médiateurs de

l'inflammation, en particulier les prostaglandines E2, les leucotriènes B4 et l'acide 5-hydroxyéicosatétranoïque (Jett *et al.*, 1994). Au final, la réponse par des vomissements à ces toxines dépend de l'activation du centre du vomissement dans le cerveau, stimulé par des impulsions transmises par les nerfs vagues sympathiques.

2.1.2.2. La toxine du syndrome du choc toxique

Le syndrome du choc toxique est une maladie aiguë et pouvant être fatale qui se caractérise notamment par une fièvre élevée, un érythème diffus, de l'hypotension, et une desquamation de la peau deux à trois semaines après les premiers signes (si la maladie n'a pas été fatale avant). Le syndrome du choc toxique est souvent observé chez des jeunes femmes pendant leurs règles, et est souvent associé à l'utilisation de tampons et à la présence de *S. aureus* au niveau vaginal ou cervical. TSST-1 est la seule des PTSAgS à pouvoir traverser les membranes muqueuses (Hamad *et al.*, 1997).

L'activation des cellules T par les PTSAgS est généralement considérée comme une cause de choc mortel chez les patients avec un syndrome du choc toxique, chez qui ces toxines agissent en tant que super-antigènes (Miethke *et al.*, 1993). Une conséquence potentiellement fatale d'une activation des cellules du système immunitaire par les PTSAgS est la libération de grandes quantités de monokines et de lymphokines par les macrophages hôtes de la bactérie et par les cellules T. L'augmentation de l'activité des endotoxines par les PTSAgS est aussi certainement responsable de leur possible caractère létal. De plus, les PTSAgS ont des effets directs sur les cellules endothéliales. En plus de causer la libération de médiateurs vaso-actifs tels que les TNF- α par les leucocytes hôtes, les PTSAgS peuvent être responsables d'hypotension en se liant directement à des récepteurs sur les cellules endothéliales.

Lors d'une étude sur 27 fermes, Matsunaga *et al.* (1993) montrait que toutes les souches de *S. aureus* isolées lors de mammites aiguës produisaient notamment les toxines TSST-1 et SEC décrites précédemment, et en déduisait que ces deux toxines contribuaient aux mammites bovines, en particulier aiguës.

Deux groupes de facteurs de virulence, les leucotoxines et les superantigènes, jouent un rôle important dans l'initiation ou l'exacerbation des infections mammaires à *Staphylococcus*

aureus. Une étude de Schuberth *et al.* (2001) a montré que les différents isolats de *S.aureus* produisent des leucotoxines ou des superantigènes. La prévalence d'isolats produisant des leucotoxines et celle de ceux produisant des superantigènes est comparable parmi les vaches présentant des mammites subcliniques.

2.2 – Les enzymes

Il s'agit de lipases, protéases (dont la staphylokinase), nucléases, hyaluronidases (à l'origine de troubles de la coagulation), collagénases, et coagulases.

Les lipases sont sécrétées sous la forme de pro-lipases. Elles sont converties en enzymes matures dans le milieu extracellulaire grâce à une protéase spécifique sécrétée par la bactérie. Ces protéines sont organisées selon le type pré-pro-enzymes : la pré-région représente le signal lipidique, la partie mature est un peu plus longue que la pro-région. La pro-région protège la partie active de la molécule d'éventuelles dégradations protéolytiques. Cette enzyme a seulement une activité de lipase (Gotaz *et al.*, 1998).

La staphylokinase est un agent pro-fibrinolytique. Elle forme un complexe avec le plasminogène, qui, converti ainsi en plasmine, active d'autres molécules de plasminogène. Dans le plasma, cette enzyme peut dissoudre des amas de fibrine sans pour autant y associer une dégradation du fibrinogène. Après des études expérimentales sur plusieurs modèles animaux, la staphylokinase est apparue équivalente à la streptokinase dans son action de dissolution de sang total ou d'amas de plasmine, mais significativement plus puissante dans son action sur des thrombi rétractés ou riches en plaquettes (Collen *et al.*, 1995).

2.3 – Les composants de surface

Il s'agit de protéines qui jouent un rôle d'adhésines, et d'exopolysaccharides capsulaires.

2.3.1. Adhésines

Des protéines sont associées à la paroi des cellules Gram-positive (Foster *et al.*, 1994). La portion C-terminale de ces protéines est impliquée dans leur sécrétion et leur attachement à

la surface des bactéries. Les domaines N-terminaux interagissent avec la cellule hôte en se liant à des protéines solubles de l'hôte, à des protéines de la matrice cellulaire ou aux cellules hôtes elles-mêmes (cellules épithéliales, cellules endothéliales et fibroblastes). Elles ont un rôle important dans la pathogénicité en permettant aux bactéries d'éviter les défenses de l'hôte et en agissant comme des adhésines. Quatre protéines de ce type ont été reconnues chez *S. aureus* :

- la protéine A (« immunoglobulin binding protein »),
- les protéines de liaison aux fibronectines,
- la protéine de liaison au collagène,
- la protéine de liaison au fibrinogène (« clumping factor »).

La protéine A et la protéine de liaison au fibrinogène ne sont pas isolés à partir de souches de *S. aureus* responsables de mammites aiguës, ils sont isolés très fréquemment de souches responsables de mammites chroniques (Matsunaga *et al.*, 1993).

En plus de leurs actions individuelles, les différents facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* peuvent interagir entre eux, par exemple au niveau de l'endothélium des vaisseaux. La manifestation intravasculaire d'une infection à *S. aureus* est souvent associée à une maladie très grave, qui peut avoir des conséquences catastrophiques : la maladie endovasculaire (Chavakis *et al.*, 2005). De nombreux facteurs issus de l'hôte contribuent au tropisme endothelial de *S. aureus* : les protéines de la matrice subendothéliale, les récepteurs des cellules endothéliales, les plaquettes qui se retrouvent fixées aux adhésines de la paroi cellulaire de la bactérie, telles que les protéines liant le fibrinogène. Des protéines bactériennes sans homologie les unes envers les autres, telles que la coagulase, la protéine liant le fibrinogène extra-cellulaire, la protéine liant la matrice extra-cellulaire, ou la protéine adhésive extra-cellulaire sont les produits bactériens prédominants qui sont associés avec la maladie endovasculaire. Elles sont appelées « secretable expanded repertoire adhesive molecules » (SERAM).

2.3.2. Exopolysaccharides capsulaires

L'interaction de *S. aureus* avec son hôte dépend fortement de ses propriétés de surface. En plus du processus d'adhésion permis par les adhésines décrites précédemment, un autre processus de colonisation de *S. aureus* est la formation de slime. Il s'agit d'un glycocalyx

composé d'exopolysaccharides qui jouent un rôle important dans la virulence (Baselga *et al.*, 1994). Ce glycocalyx forme un biofilm qui confère aux bactéries qu'il entoure une forme de résistance vis-à-vis des défenses de l'hôte ou des antibiotiques.

Nous avons vu en détail quels étaient du point de vue bactériologique les facteurs de virulence de la bactérie utilisée dans nos expérimentations, *Staphylococcus aureus*. Afin de comprendre ultérieurement les résultats observés, nous allons maintenant nous pencher sur les interactions entre cette bactérie et la mamelle des ruminants lors d'une infection. La suite de ce travail de synthèse bibliographique présente par quelles modifications histologiques la mamelle infectée répond, où sont présentes les bactéries lors d'une infection et quelles sont les modalités de leur excrétion, et enfin, comment la mamelle réagit de manière immunologique, et les caractéristiques de cette réponse cellulaire.

3- Interactions entre *Staphylococcus aureus* et son hôte dans le cas des mammites

3.1- Réponse de la mamelle : modifications histopathologiques

Suite à une infection expérimentale intra-mammaire par *S. aureus*, les tissus mammaires présentent plus de zones stromales interalvéolaires, une lumière alvéolaire réduite, et plus de zones épithéliales alvéolaires abîmées ou involuées (Nickerson *et al.*, 1981). Ces changements sont plus avancés à dix jours qu'à deux jours post-infection, indiquant qu'à dix jours, le parenchyme glandulaire perd son potentiel de sécrétion. Deux jours puis dix jours après avoir induit une mammite à *Staphylococcus aureus* chez des bovins laitiers, du tissu mammaire provenant de deux zones de quartiers infectés a été comparé à celui de deux zones des quartiers controlatéraux, non infectés. Les différentes zones des quartiers présentent de grandes différences en réponse à l'infection. Le parenchyme prélevé dans une zone d'un quartier infecté près de la partie glandulaire du sinus du lait évolue plus rapidement qu'une zone plus éloignée du sinus, probablement parce que cette zone est plus proche de la voie d'entrée des bactéries inoculées et donc plus facilement affectée par les toxines et les co-produits bactériens. Il existe une corrélation entre les différents composants du tissu mammaire. Ainsi, alors que l'épithélium endommagé et non sécrétoire, le stroma, les lumières contenant des débris et des polymorphonucléaires neutrophiles se développent, l'épithélium sécrétoire et les lumières alvéolaires involuent progressivement, le tout témoignant d'une perte du potentiel sécrétoire de cette zone.

Le parenchyme involué possède alors moins d'épithélium sécrétoire donc une activité sécrétoire réduite, un épithélium non sécrétoire plus important, des zones luminales réduites, et un tissu de connexion abondant. Une portion d'épithélium non sécrétoire prélevée à partir d'une zone involuée proche du sinus était marquée dans cette étude par la présence d'Immunoglobulines A.

L'étude de l'ultrastructure des tissus de contrôle montre que l'épithélium sécrétoire est typique d'un tissu mammaire sain. Les cellules sont polarisées avec un noyau rond situé médialement ou en région basale, elles possèdent un réticulum endoplasmique étendu sur les

côtés latéral et basal du cytoplasme et un appareil de Golgi supra-nucléaire très développé. Les cellules du tissu épithélial endommagé étaient adhérentes à la membrane basale de manière lâche, les membranes cellulaires étaient indistinctes, et, dans certaines zones le cytoplasme paraissait gonflé. Beaucoup de mitochondries étaient également gonflées, le réticulum endoplasmique avait une forme vésiculaire, les composants du Golgi étaient indistincts.

Les auteurs s'interrogeaient sur la cause du dommage causé à l'épithélium sain. Des coques libres étaient seulement rarement observés près de l'épithélium alvéolaire, la plupart des coques étaient à l'intérieur des phagocytes, aussi ne pouvait-on pas affirmer qu'il y avait un effet direct des bactéries. Toutefois, des toxines produites par des bactéries en multiplication dans d'autres zones de la glande auraient pu diffuser à travers les canaux vers le parenchyme et y produire ces dommages.

Bien que des cellules saines identiques à celles des quartiers de contrôle aient été observées dans des tissus infectés, il y avait toujours une portion de l'épithélium alvéolaire qui était endommagée de manière importante et subissait une nécrose. L'autre portion subissait une différenciation et revenait à un état non sécrétoire, ou était déjà présente dans sa forme modifiée. Les zones occupées par du tissu non sécrétoire augmentaient entre le deuxième et le dixième jour ; il restait alors à déterminer si le tissu se répare de lui-même ou s'il y a une hypertrophie compensatoire du tissu sain.

Ces résultats concernant les conséquences histologiques néfastes d'une inoculation par *S. aureus* sur le tissu mammaire se retrouvent dans une étude ultérieure (Gudding *et al.*, 1984). Trois vaches en lactation ont été infectées expérimentalement avec *Staphylococcus aureus* ATCC 29740 (souche Newbould 305). Les vaches ont été euthanasiées 2 à 116 heures après l'inoculation. Les changements histopathologiques observés étaient ici aussi un gonflement progressif des cellules, une dégénérescence vacuolaire des couches épithéliales, et, de plus, des foyers multiples d'érosions épithéliales et d'ulcères à travers le système caniculaire de la mamelle.

3.2- Excrétion bactérienne suite à une inoculation

3.2.1. Localisation des bactéries dans une mamelle infectée

On considère que l'interaction de *S. aureus* avec les cellules de la glande mammaire des bovins joue un rôle essentiel dans la pathogénie des mammites. Dans une étude de Lammers *et al.* (1999), une nouvelle cellule-cible pour l'adhésion et l'invasion de *S. aureus* a été identifiée. L'équipe a cultivé des cellules qui composent les alvéoles des glandes mammaires. Dans ces cultures, deux types cellulaires différents ont été observés : des cellules allongées et des cellules cubiques. *S. aureus* adhère spécifiquement aux cellules allongées, et en très grand nombre : environ 300 bactéries par cellule. Aucune adhésion aux cellules cubiques n'a été observée. De plus, les bactéries ont aussi été trouvées dans les cellules, proches des membranes des vésicules intracellulaires. L'adhésion et l'invasion étaient maximales après quatre heures.

Gudding *et al.* (1984) observèrent la répartition des cellules somatiques et des bactéries suite à une infection expérimentale. Des examens bactériologiques et microscopiques montrent que *Staphylococcus aureus* s'attache aux cellules épithéliales de la glande mammaire *in vivo*. La réponse cellulaire des glandes infectées consiste en une augmentation rapide du nombre de cellules somatiques dans les sécrétions mammaires et en une accumulation de neutrophiles en dessous, à l'intérieur, et sur l'épithélium du trayon et des sinus du lait. Deux à dix jours après l'infection expérimentale avec des bactéries en faible nombre, les auteurs observent des bactéries en très faible nombre dans la lumière alvéolaire et en association avec l'épithélium.

L'objectif de l'étude menée par Hensen *et al.* (2000) était de localiser *Staphylococcus aureus* dans la mamelle des vaches laitières et d'étudier l'expression du polysaccharide capsulaire type 5 (CP5) *in situ*, lors des stades précoces et chroniques d'infections intramammaires expérimentales à *S. aureus* Newbould 305. Du tissu mammaire bovin a été prélevé lors des stades précoces et chroniques de l'infection, c'est-à-dire 24 à 96 heures post-inoculation puis au jour 122. Les altérations histologiques furent les mêmes que celles décrites au paragraphe 3.1. La présence et la localisation de la bactérie ont été étudiées en utilisant une coloration de Gram sur des sections de tissus. Lors des stades précoces et

chroniques de l'infection, *S. aureus* est localisé dans les lumières des alvéoles et dans les canaux du lait, en association avec l'épithélium, et dans les cellules phagocytaires. Les staphylocoques sont principalement observés en tas et souvent en présence de polymorphonucléaires neutrophiles. L'expression de CP5 a été recherchée par immunochimie en utilisant des anticorps spécifiques anti-CP5. En général, les *S. aureus* CP5-positifs étaient situés dans les alvéoles et en association avec l'épithélium mammaire. Lors d'infection chronique, les *S. aureus* CP5-positifs étaient de plus localisés dans le tissu interstitiel. Ces résultats indiquent que, aussi bien en phase précoce que chronique, la colonisation du tissu mammaire et l'invasion des bactéries ont lieu jusque dans le tissu interstitiel, et que CP5 est exprimé par les *S. aureus* souche Newbould 305 *in situ*. L'invasion de *S. aureus* dans le tissu interstitiel et l'expression de CP5 aident probablement la bactérie à résister aux mécanismes de défense de l'hôte.

3.2.2. Cycle d'excrétion des bactéries dans le lait

Le schéma d'excrétion de *S. aureus* a été étudié lors d'une expérience menée par Sears *et al.* (1990). Cette expérience se proposait d'étudier les méthodes employées pour le diagnostic d'infections intra-mammaires. Il existe en effet différentes méthodes d'échantillonnages : l'échantillonnage simple implique la récolte d'échantillons de lait à une seule traite ; la collecte de deux ou plus échantillons de lait à des traites différentes est nommée « consecutive sampling ». Dans cette étude, les objectifs étaient d'observer et de comparer la sensibilité de ces deux méthodes d'échantillonnage à partir de lait de bovins dont les mamelles avaient été inoculées avec *S. aureus* (ATCC 29740). En plus de cela, des vaches d'un troupeau commercial ont été prélevées pour étudier le schéma d'excrétion de *S. aureus* lors d'infections naturelles. Chaque quartier a reçu une infusion intra-mammaire de 1mL de *S. aureus* vivant. Cette dose a été inoculée via un cathéter inséré dans le sinus du trayon. Un quartier dit « de contrôle » a été laissé non inoculé chez chaque vache. Pour établir le schéma d'excrétion de *S. aureus*, 56 échantillons de lait consécutifs ont été prélevés sur chaque quartier inoculé suite à l'inoculation. L'intervalle entre deux prélèvements (deux traites quotidiennes) a été le même tout le long de l'expérimentation. Le nombre d'Unités Formant Colonies (UFC) sur les géloses a été compté. De la 5^{ème} à la 55^{ème} traite post-inoculation, les SCC ont été convertis en scores linéaires.

Avant l'inoculation, on a obtenu des cultures négatives pour les cinq traites, et le score linéaire moyen de ces quartiers était de $3,2 \pm 1,0$. Dix-neuf des vingt-et-une glandes mammaires inoculées furent infectées (90%). *S. aureus* a été ré-isolé. Aucun autre pathogène n'a été isolé, à l'exception de contaminants de l'environnement dans 98 des 1101 cultures. Les sept quartiers de contrôle sont restés négatifs tout au long de l'expérience.

Deux cycles d'excrétion différents de *S. aureus* ont été identifiés :

- un cycle d'excrétion « à bas bruit » (≤ 1000 UFC/mL) (16 glandes sur 19, 8 appartenant à des primipares, 8 à des multipares)
- un cycle d'excrétion « à haut bruit » (≥ 2000 UFC/mL), pour les trois glandes restantes, appartenant à deux vaches primipares.

Les scores linéaires moyens de ces cycles haut et bas n'étaient pas significativement différents ($6,4 \pm 0,54$ versus $6,5 \pm 0,61$).

Dans cette étude, un échantillonnage unique n'est pas la méthode la plus adaptée pour déterminer le statut infectieux d'un quartier infecté expérimentalement par *S. aureus*. Pour les glandes excréant à bas bruit, il y a plus de risque de trouver des faux négatifs quand on utilise une méthode avec échantillonnage unique comme seul moyen de détermination du statut infectieux du quartier. Le risque d'obtention d'un faux négatif en utilisant un simple échantillon est estimé comme étant approximativement de 25% pour les inoculations expérimentales. Du fait de la nature cyclique de l'excrétion de *S. aureus*, une méthode d'échantillons successifs comme moyen de détection de l'infection semble améliorer la probabilité d'obtenir un diagnostic précis. Suivre l'excrétion de *S. aureus* jour après jour a montré qu'on peut obtenir une culture négative de manière répétée au cours du cycle. Des interruptions de ce cycle peuvent être rencontrées lorsqu'un traitement est appliqué. Newboud (1974) a montré que cela pouvait prendre jusqu'à 28 jours pour que l'infection à *S. aureus* réapparaisse après un traitement. Ceci est à prendre en compte quand on évalue l'efficacité d'antibiotiques lors du traitement de mammites à *S. aureus*.

En conclusion, quand on ne connaît pas le profil d'excrétion du germe, la précision de l'utilisation d'un échantillon simple ou dupliqué dans le diagnostic d'infection intramammaire reste douteuse.

3.3 - Réponse cellulaire

Historiquement, on étudiait les sous-populations cellulaires d'un lait en colorant des frottis de lait au May-Grünwald Giemsa, en les observant, et en comptant le nombre de cellules de chaque sous-population.

3.3.1. Les cellules du lait d'une mamelle saine

Dans le lait de brebis bactériologiquement négatif, on trouve les mêmes types de cellules que dans le lait de vache, dans les proportions moyennes suivantes (Bergonier *et al.*, 2003) :

- polynucléaires neutrophiles : 10-35%,
- macrophages : 45-85%,
- lymphocytes : 10-17%,
- cellules épithéliales : moins de 2-3% des cellules somatiques, dérivées des conduits et sinus du lait.

Ces pourcentages sont proches de ceux observés chez la vache. Dans les deux espèces, le **macrophage** est la cellule la plus représentée dans le lait sain et il y a une forte corrélation entre le pourcentage en polynucléaire neutrophile et le CCS. Dans le tableau 2 page 47 sont résumés les pourcentages des différents types cellulaires dans du lait de demi-mamelles non infectées, tels qu'ils ont été évalués lors de différentes études sur des brebis (d'après Bergonier *et al.*, 2003).

Tableau 2 : Pourcentages des types cellulaires dans un lait de brebis bactériologiquement négatif (Bergonier *et al.*, 2003) (n : nombre de brebis étudiées) :

Année de l'étude	n	Stade de lactation	Neutrophiles	Macrophages	Lymphocytes	Référence de l'étude
1985	84	milieu de lactation	26,5 à 58,5	-	-	a
1985	12	tarissement précoce	69,7 à 85,8	-	-	a
1985	91	milieu de lactation	10 à 90	0 à 60	8 à 18	b
1976	6	mamelle sèche	-	84	6	c
1981	6	colostrum	41 à 84	8 à 49	6 à 11	d
1981	6	milieu de lactation	-	83 à 86	10 à 17	d
1999	-	toute la lactation	30	60	8	e
1996	640	toute la lactation	34,9	-	-	f
1996	10	toute la lactation	30,6	57,3	8,2	g
2001	40	milieu et fin de lactation	31,1 à 51,6	-	-	h

a : Fruganti *et al.*, 1985.

b : Gonzalo *et al.*, 1985.

c : Lee *et al.*, 1976.

d : Lee *et al.*, 1981.

e : Morgante *et al.*, 1996 b.

f : Morgante *et al.*, 1996 a.

g : Morgante *et al.*, 1996 c.

h : Moroni *et al.*, 2001.

3.3.2. Les types cellulaires du lait d'une mamelle infectée

Lors de processus inflammatoire de la glande mammaire, les différents types de cellules restent les mêmes, mais leur distribution change de façon notable (Ranucci *et al.*, 1999). Dans une glande infectée, les cellules hôtes sont constituées de 95% ou plus de polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) (Daley *et al.*, 1991 b). Dans certaines des études citées précédemment, un typage des cellules du lait avait été réalisé sur des quartiers infectés, les résultats obtenus sont exposés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Pourcentages des types cellulaires dans un lait de quartier infecté de brebis (Bergonier *et al.*, 2003) (n : nombre de brebis étudiées) :

<i>Année de l'étude</i>	<i>n</i>	<i>Stade de lactation</i>	Neutrophiles	Macrophages	Lymphocytes	<i>Référence de l'étude</i>
1996	640	toute la lactation	52,1 à 82,2	-	-	f
2001	40	milieu et fin de lactation	65,9 à 77,6			h

3.3.3. Nature cyclique de l'activation leucocytaire concomitante à l'excrétion

Comme nous l'avons vu plus haut, une mammite à *S. aureus* est associée à une augmentation et diminution cycliques de la quantité de bactéries vivantes excrétées dans le lait. De manière concomitante et asynchrone avec ce cycle des bactéries, il existe un cycle inverse des cellules hôtes dans le lait.

Les capacités de ces cellules ont été évaluées en mesurant leur efficacité à tuer des bactéries ou à les phagocyter à différents moments de l'infection (Daley *et al.*, 1991 b). L'effet bactéricide le plus efficace a été mesuré au cours du pic de comptage des cellules

somatiques et autour de ce pic. La capacité des cellules de ces cycles à ingérer des particules fluorescentes en latex a aussi été quantifiée en utilisant la cytométrie de flux. Le pourcentage de cellules polymorphonucléaires phagocytiques qui ont ingéré ces particules s'étalait de 15 à 80% de la population cellulaire totale durant le cycle, et tendait à être maximale au pic des CCS et autour du pic. De plus, le nombre moyen de particules ingérées variait entre 1 et 2 particules par cellule polymorphonucléaire, avec cependant non moins de 17% des cellules qui en ingéraient 4 ou plus.

Les polymorphonucléaires des quartiers infectés avec *S.aureus* varient donc de manière quantitative (CCS total) et qualitative (activité bactéricide et capacité de phagocytose) au cours de l'infection. Non seulement la quantité de cellules phagocytaires de l'hôte dans la glande mammaire est centrale dans le mécanisme de défense contre l'infection, mais l'état d'activation biologique de ces cellules apparaît également important.

Le développement d'une mammite chronique à *Staphylococcus aureus* dépend de l'interaction entre les bactéries et ces cellules du système de défense. Bien que celui-ci soit efficace pour éliminer 3 à 4 logs de bactéries, il a été suggéré que des polymorphonucléaires moins activés contribuaient en fait à la sortie d'une infection préexistante et à une mammite à *Staphylococcus aureus* à caractère cyclique. De plus, une fois les germes phagocytés, ils pourraient être protégés des effets des antibiotiques.

Les mécanismes de défense de l'hôte peuvent être stimulés par les pathogènes et leurs co-produits, et différents modificateurs de la réponse biologique, dont les cytokines (Daley *et al.*, 1991 a). Celles-ci régulent l'efficacité de la réponse immunitaire en réponse aux pathogènes. Par exemple, l'interleukine 1, bien qu'ayant une activité pléiotropique, peut activer les lymphocytes B, T, les macrophages, et d'autres cellules primaires et secondaires du système immunitaire. L'interleukine 2 est une glycoprotéine dérivée des lymphocytes qui induit l'activation clonale des cellules B et T, et, ce faisant, elle initie aussi la sécrétion secondaire d'autres types de cytokines par les lymphocytes activés. Une infusion intra-mammaire d'interleukines bovines recombinantes 1 β et 2 provoque la même réponse cellulaire qu'une inoculation de *S.aureus* : tous trois augmentent le nombre de cellules somatiques après une inoculation intra-mammaire et activent la production de superoxyde inductible dans les leucocytes polymorphonucléaires du lait. L'interleukine 2 active aussi la phagocytose de ces cellules. Cette activation est maintenue trois à cinq jours après l'administration intra-mammaire. Les cytokines recombinantes homologues sont des immunomodulateurs efficaces qui augmentent les mécanismes de défense naturels de la même

façon que lors d'une réponse normale aux pathogènes. Elles pourraient être des alternatives adaptées aux antibiotiques, ou être utilisées en ajout de ceux-ci.

Cette étude montrait aussi à nouveau l'activation de l'activité polymorphonucléaire de l'hôte après une inoculation intra-mammaire de *S. aureus*, ainsi que la nature cyclique de l'activation cellulaire.

En conclusion, sur les interactions entre *Staphylococcus aureus* et la mamelle des ruminants, on retiendra que, dans le modèle expérimental de mammite à *S. aureus*, des **variations cycliques du nombre d'unités formant colonies** (par mL de lait) sont observées. Ces cycles apparaissent de manière concomitante mais **asynchrone de celui des cellules somatiques** (> 90-95% de PMN en cytométrie de flux).

Ce travail de synthèse bibliographique a permis de resituer l'étude expérimentale suivante dans le cadre de la filière laitière de manière générale. Nous allons maintenant aborder la partie expérimentale de cette thèse, premières expériences pour tenter de répondre à la question suivante : que se passe-t-il dans une mamelle infectée dont a diminué par une sélection génétique le nombre de cellules présentes ?

- Deuxième partie -

Etude expérimentale :

Inoculation intra-mammaire de
Staphylococcus aureus chez la
brebis

En mars et avril 2005 à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, deux séries d'infections expérimentales ont été réalisées sur des brebis : il y sera fait référence en tant que « essai 1 » et « essai 2 ». Il s'agissait d'inoculations intra-mammaires de *Staphylococcus aureus* chez des brebis Lacaune issues de deux lignées divergentes sur le critère du comptage cellulaire.

Le présent travail de thèse s'inscrit dans le cadre plus large de l'étude, initiée par l'INRA-SAGA (Toulouse), d'évaluation de la sélection génétique actuelle sur la résistance aux mammites fondée sur la valorisation des comptages de cellules somatiques (CCS). L'objectif global de cette étude est également de mieux comprendre, au travers de la comparaison de deux lignées génétiques divergentes, les mécanismes immunitaires liés à la glande mammaire lors d'une infection expérimentale à *S. aureus*.

1- Matériel et méthodes

1.1- Sélection des animaux

Les brebis arrivées à l'école vétérinaire en mars 2005 provenaient du domaine INRA de La Fage dans l'Aveyron. Elles étaient issues d'accouplements raisonnés de mâles d'index extrêmes dans la population de béliers Lacaune pour le critère CCS et de femelles de phénotypes extrêmes dans le domaine. Le modèle est donc basé sur une première génération de brebis laitières Lacaune issues d'une sélection divergente sur la base des comptages cellulaires.

Les lignées dont sont issues les brebis utilisées dans les essais ont été créées à La Fage. Deux groupes de sept béliers génétiquement testés, c'est-à-dire 5% des béliers avec des valeurs d'élevage estimées (« Estimated breeding values », noté EBV) fiables ($CD \geq 0,70$) et extrêmes, ont été utilisés pour saillir deux groupes d'agnelles des ex-lignées lait (Rupp *et al.*, 2006). Les béliers Lacaune dont il est question sont issus du noyau de sélection qui comprend 600 troupeaux. Il a été fait attention à ne pas prendre de mâles de la même famille. Les béliers devaient de plus avoir des EBV similaires et favorables pour la production laitière, afin d'éviter la confusion entre la sélection sur la production de lait et la sélection sur les CCS. Les

agnelles ont été triées en deux groupes de brebis à La Fage. L'insémination artificielle a eu lieu en juillet 2003, et les brebis de première génération de cette sélection sont nées en novembre 2003. Elles ont été inséminées à leur tour par des béliers d'index moyens en juillet 2004, et ainsi 49 brebis de première génération de la lignée haute (CCS+) et 39 brebis de la lignée basse (CCS-) ont commencé leur première lactation en janvier 2005.

Parmi ces brebis de première génération, un lot CCS- et un lot CCS+ ont été conduits à l'Ecole Vétérinaire de Toulouse en mars 2005 pour l'essai 1, puis deux autres lots en avril 2005 pour l'essai 2. Les brebis ont été choisies parmi celles ayant une mamelle saine, c'est-à-dire :

- des bactériologies négatives avant leur départ de La Fage,
- des comptages cellulaires individuels (marqueurs de l'inflammation de la mamelle) les plus faibles possibles,
- une absence de lésions de la mamelle ou d'anomalies morphologiques.

Elles avaient des productions laitières à La Fage relativement homogènes les unes par rapport aux autres. Il a été fait attention à ne prendre qu'une fille par mâle.

Des prélèvements avaient été réalisés en vue d'effectuer des mesures de Vitamines A et E, de Sélénium, Cuivre et Zinc afin de vérifier l'absence de carence des animaux en vitamines ou oligoéléments à action immunostimulante.

1.2- Protocole quotidien d'examen clinique et de prélèvements

1.2.1. Fréquence de traite, alimentation des brebis

Les traites ont été réalisées de façon biquotidienne, approximativement aux mêmes heures tous les jours (8h et 18h), en respectant toujours le même intervalle de temps entre les deux traites. Les traites ont été faites durant toute la durée des deux expérimentations par la même équipe de personnes : un animalier, Marion notre assistante, les deux thésardes (Françoise et moi-même), et, alternativement, M. Foucras ou M. Bergonier.

La traite se déroulait matin et soir selon un protocole précis, lors duquel, en plus de la traite et de l'alimentation en concentrés des brebis, étaient réalisés le suivi clinique, la mesure de la quantité de lait produite par hémimamelle, des prélèvements de lait pour les comptages cellulaires et pour les analyses bactériologiques et des prises de sang quand nécessaire.

L'équipe de traite faisait monter les brebis sur le quai. La ration de concentrés était distribuée : 500 grammes par brebis de concentré de production (FedaxelND), et 500 grammes par brebis de bouchons de luzerne. A compter de l'arrivée des brebis, ces quantités de concentrés ont été atteintes progressivement en 3 à 4 jours. Le reste de la journée, les brebis avaient du foin et de l'eau à volonté.

Les numéros des brebis étaient notés sur les fiches d'examens cliniques, en démarrant à chaque traite du même côté du quai. Il y avait une fiche de suivi par séance de traite.

1.2.2. Prise de température

La température rectale était prise une fois par jour et consignée dans les fiches de suivi. Par la suite, quand on tracera les courbes des moyennes géométriques des températures par lot, on les comparera à un seuil de 39,5°C, température au-dessus de laquelle on considère qu'il y a une hyperthermie significative.

1.2.3. Examen clinique de la mamelle pleine

Un examen clinique sur la mamelle pleine était effectué à la traite du matin et du soir, comprenant une inspection de la mamelle et l'observation d'un éventuel déséquilibre, codifié comme suit, en donnant une note au côté le plus petit :

- N : normal,
- 1 : très léger déséquilibre,
- 2 : léger déséquilibre,
- 3 : fort déséquilibre,
- 4 : atrophie unilatérale.

1.2.4. Prélèvements de lait pour les comptages cellulaires du lait des premiers jets

Des prélèvements pour le comptage cellulaire du lait étaient effectués (traites du matin et du soir) : il s'agissait de deux prélèvements successifs par demi-mamelle sur la première fraction, c'est-à-dire les tous premiers jets, sans mélange avant constitution de ces échantillons pour respecter l'effet intra-fraction. Ces premiers jets étaient prélevés dans des

pots pour comptage cellulaire, aux parois enduites de bronopol. Les pots étaient remplis au maximum, avec le moins de mousse possible. Le contenu de ces pots (25 mL par pot) était par la suite intégré dans la mesure de production laitière quotidienne.

Les pots étaient identifiés comme suit : numéro de brebis, côté (quartier droit D ou gauche G), ordre (a pour le premier prélèvement, b pour le deuxième).

Exemple : 0413 D Ia

Enfin, les pots étaient groupés dans un carton de transfert, et conservés au froid (+ 4°C) avant d'être acheminés au CIAL SO (Centre Interprofessionnel d'Analyse Laitière du Sud-Ouest, Auch).

1.2.5. Traite complète, mesure de production, lait de mélange

La traite complète était effectuée dans des récipients en plastique, nettoyés et désinfectés entre deux traites, avec mesure de la production laitière par demi-mamelle à l'aide d'éprouvettes graduées.

La mesure quotidienne de la production laitière par demi-mamelle était dans notre étude un des principaux critères d'évaluation clinique des effets induits par les inoculations. En conséquence, pour les traites du matin et du soir :

- la traite était effectuée à fond mais sans repasse : on trayait à fond le côté gauche d'une brebis, la production était notée, puis on trayait à fond le côté droit avec un autre récipient, et la production était notée également. L'essentiel était de ne pas traire à nouveau une demi-mamelle déjà vidangée. Pour réduire l'effet trayeur sur la production laitière mesurée, une personne unique (Marion) achevait la traite de toutes les demi-mamelles.

- afin de réaliser par la suite des comptages cellulaires sur lait de traite, l'ensemble du lait de la demi-mamelle était versé dans une bouteille plastique propre si la quantité excédait le premier récipient utilisé pour la traite. Le tout était homogénéisé par de petits mouvements circulaires. Deux pots supplémentaires de comptage cellulaire étaient remplis à partir de ce lait et identifiés : numéro de la brebis, côté G ou D, IIa ou IIb.

- sur les fiches d'examens cliniques et de prélèvements étaient notées ces productions en mL, sans inclure à ce moment-là dans la fiche le volume contenu dans les pots de comptages cellulaires (aucun des 4).

- enfin, le nombre de pots pour le comptage cellulaire réalisés était noté sur la fiche de suivi de la séance. En cas d'hypogalactie induite par l'inoculation, les quantités de lait produites ne permettaient en effet pas toujours de remplir les quatre pots décrits précédemment.

- ces derniers pots étaient groupés dans le carton de transfert avec les précédents et conservés au froid avant leur transport vers le CIAL SO.

Les pots de comptage cellulaire étaient disposés dans les cartons du CIAL SO de la manière suivante : par ordre croissant d'identification (Ia, Ib, IIa, IIb) pour chaque demi-mamelle, gauche avant droite, brebis par brebis. Les prélèvements étaient déposés à 3A à Toulouse pour le LIAL trois fois par semaine.

1.2.6. Prélèvements aseptiques de lait

A la traite du matin étaient réalisés des prélèvements aseptiques de lait par demi-mamelle pour des analyses bactériologiques. Ils étaient effectués entre la traite des premiers jets et la traite complète. La plus grande attention était portée à la non contamination de ces prélèvements.

Un opérateur aux mains propres et passées à l'alcool nettoyait l'apex du trayon avec une compresse imprégnée d'alcool à 70°C, et pressait le quartier de façon à faire jaillir un jet de lait dans un tube stérile tenu par un deuxième opérateur et ouvert au dernier moment. Ce tube était immédiatement refermé, et identifié (numéro de la brebis, côté G ou D et date). Ces prélèvements étaient regroupés et réfrigérés le plus rapidement possible après la traite (+ 4°C).

1.2.7. Couleur de la mamelle

On notait la couleur de chaque demi-mamelle après la traite :

- N : couleur normale,
- 1 : couleur rose plus marquée que la normale,
- 1+ : demi-mamelle rouge,
- 2 : couleur violacée.

On notait également la présence éventuelle de gangrène sur la demi-mamelle, en précisant son extension (trayon, mamelle, abdomen).

1.2.8. Palpation de la mamelle vide

En fin de séance, on effectuait une palpation de la mamelle vide. On cherchait à détecter une induration éventuelle, des abcès, des kystes lactés...On évaluait la taille des nœuds lymphatique. Tout ceci était noté de manière codifiée dans la fiche de suivi.

1.2.8.1. Induration diffuse

Le degré d'induration globale de la demi-mamelle par rapport à l'autre côté était évalué. Une partie seulement de la mamelle pouvait être modifiée. On inscrivait le côté anormal, voire chaque côté en cas de double atteinte :

- N : demi-mamelle souple,
- 1 : une demi-mamelle légèrement plus dure (consistance du nez),
- 2 : une demi-mamelle nettement plus dure (consistance du front).

1.2.8.2. Abcès

Les abcès sont définis comme des indurations circulaires, de nombre et de taille variables (tête d'épingle à balle de tennis), situées dans le parenchyme mammaire (partie sécrétrice) ou en périphérie de celui-ci, parfois en zone ganglionnaire, exceptionnellement en zone citernale (basse). Leur consistance est dure à très dure, ils peuvent éventuellement se fistuliser : de petits abcès superficiels peuvent affecter la paroi des trayons.

S'ils étaient indénombrables, on notait « plusieurs ».

On notait :

- N : aucun abcès,
- P : petits abcès (de la taille d'une tête d'épingle à celle d'une noisette), et le nombre,
- G : gros abcès (taille supérieure à celle d'une noisette : cerise..), en précisant le nombre.

1.2.7.3. Nœuds lymphatiques supra-mammaires

Les nœuds lymphatiques supra-mammaires sont situés en arrière et au-dessus du parenchyme, de part et d'autre du ligament suspenseur, entourés de tissu adipeux. On peut palper un à plusieurs ganglions de chaque côté.

On compare les nœuds lymphatiques gauche et droit, on rajoutait éventuellement un « + » pour marquer la différence entre les deux côtés (exemple : N et N+) :

- 0 : impalpables
- N : taille(s) normale(s) (plus petit ou de la même taille qu'une cerise aplatie),
- R : réactionnel(s) (plus gros qu'une cerise),
- TR : très réactionnel(s) (de la taille d'une noix ou plus gros).

1.2.7.4. Kystes lactés

Les kystes lactés sont des indurations circulaires de la taille d'une noisette à celle d'un abricot ou plus, en nombre variable, pouvant être présents sous forme de chapelets, situées à la périphérie des citernes glandulaires, à proximité du septum en général, en position périphérique (« sous la peau ») et en zones déclives (sous ou devant la mamelle). La consistance est d'abord liquidienne mais peut augmenter en évoluant.

On notait :

- N : aucun kyste,
- P : petits kystes (noisette à cerise), et leur nombre,
- G : gros kystes (plus gros qu'une cerise), et leur nombre.

1.2.7.5. Autres critères descriptifs

Eventuellement, d'autres critères descriptifs ont été utiles pour décrire la mamelle palpée : gangrène (et son extension sur la mamelle), impetigo du trayon ou de la mamelle, abcès du trayon (thélite nodulaire), ecthyma, croûtes, fistulisation, pis décroché (implantation haute des trayons, difficulté de vidange des citernes), congestion du trayon, verrues, hyperkératose (apex du trayon), traumatismes du trayon...

On notait également de manière précise les modifications de la sécrétion lactée : couleur anormale, présence de grumeaux, consistance anormale, hémolactation...au moment de la traite, et après décantation.

Après chaque traite, les éprouvettes et récipients en plastique ayant servi à récolter et mesurer le lait étaient immédiatement nettoyés et désinfectés. On remplissait les râteliers de foin.

1.2.9. Calcul d'une note clinique

Comme expliqué dans les parties précédentes, des codes ont été attribués aux résultats de palpation pré- et post-traite. Des notes ont été associées de la façon suivante à cinq des critères encodés ; l'aspect macroscopique des laits n'a pas été intégré dans ce calcul.

- Déséquilibre avant la traite :

Normal N	0
Très léger déséquilibre	1
Léger déséquilibre	2
Fort déséquilibre	3
Atrophie unilatérale	4

- Abscess (palpés après la traite) :

Pas d'abcès	0
Petits abcès P	1 * nombre d'abcès
Gros abcès G	2 * nombre d'abcès

- Induration (évaluée après la traite) :

PN demi-mamelle souple	0
1 ou +	1
2 ou ++	2

- Taille des nœuds lymphatiques :

Impalpables ou normal	0
N+	0,5
R	1
R+	2
TR	3

- Rougeur :

Normal	0
Rose	1
Rouge 1+	2
Violacé	3

On a ensuite attribué à chaque demi-mamelle une note clinique en faisant la somme des notes précédentes après avoir appliqué à chacune d'elles un coefficient :

- coefficient 1 pour les déséquilibres,
- coefficient 0,5 pour les abcès,
- coefficient 1 pour l'induration,
- coefficient 2 pour les nœuds lymphatiques,
- coefficient 0,5 pour la rougeur.

Pour chaque lot, on a ensuite calculé la moyenne arithmétique de ces notes, pour le matin et pour le soir, pour le côté inoculé et le côté non inoculé, et on a tracé les courbes correspondantes. L'aspect des laits n'a pas été inclus dans la note clinique.

1.3- Définition et choix de l'inoculum

1.3.1. Définition de l'inoculum

L'objectif général du choix de l'inoculum était de développer un modèle d'infection expérimentale de la mamelle de la brebis avec une souche de *Staphylococcus aureus* permettant :

- l'établissement d'infections persistantes sans traduction clinique (sur)aiguë,
- une bonne induction des principaux effecteurs immunitaires / inflammatoires,
- l'expression et la mesure de différences immunitaires/inflammatoires en fonction des lignées si elles existent.

Plus précisément, la souche de *Staphylococcus aureus* choisie comme inoculum devait répondre aux objectifs spécifiques suivants :

- 1°) avoir une virulence modérée *in vivo* afin d'éviter la perte physique et/ou fonctionnelle des mamelles (gangrène, agalactie) et d'éviter une épreuve virulente gommant la différence entre lignées,
- 2°) être une souche isolée de mammite ovine (il existe des différences génotypiques avec les souches présentes chez la vache, en particulier au plan toxinique),
- 3°) être représentative des souches ovines, en terme de facteurs de virulence (hémolysines, leucotoxines, autres toxines, staphylokinase, adhésines, capsule, groupe *agr*...),
- 4°) cette souche devait pouvoir être inoculée avec un titre faible afin de rester proche des conditions naturelles présumées.

1.3.2. Souches utilisées pour l'essai préliminaire

Afin de choisir de manière raisonnée la souche à utiliser dans ces essais, un génotypage de souches candidates (ayant provoqué des mammites non aiguës) a été réalisé à l'INRA Pii (P. Rainard) et à l'UMR INRA-ENVT 1225. Elles ont été sélectionnées par une caractérisation moléculaire des facteurs de virulence, puis comparées *in vivo* par inoculation. Après cette pré-sélection, une sélection de trois souches candidates a été utilisée pour un essai préliminaire d'inoculation intra-mammaire à des brebis en lactation afin de choisir la souche à utiliser qui devait, en particulier, ne pas provoquer de mammites suraiguës.

Ont donc été choisies comme souches candidates :

a- une souche « représentative » des isollements ovins (THI56C), avec pour profil génotypique : *agr* 1, *Luk ED* +, *Luk MF'* +, *Luk PV* -, *hlg* v +, *sec* -, *stk* - et l'activité leucotoxique la plus faible de l'échantillon,

b- une souche présumée « hypovirulente » et n'appartenant pas au groupe majeur (B29D) : *agr* 1, *Luk ED* +, *Luk MF'* -, *Luk PV* +, *hlg* v +, *se* -, *stk* + et un titre leucotoxique minima (<1) ; de plus, B29D a un profil « humain » (*stk* +, *Luk PV* +) et présente une pentarésistance antibiotique,

c- une troisième souche, différente (SA9A), également présumée hypovirulente et de type « ovin » : *agr* 2, *Luk ED* +, *Luk MF'* +, *Luk PV* -, *hlg* v +, *sec* -, *stk* -, et un titre leucotoxique très faible

Cet essai ne fait pas partie du présent travail. Brièvement, les souches ont été inoculées à des titres approximatifs de 10^2 et 10^3 UFC/mL pour chacune d'entre elles. Elles ont été cultivées jusqu'en début de phase de plateau, inoculées par voie intra-citernale dans une seule demi-mamelle, la seconde jouant un rôle de témoin. Trois souches ont été utilisées, avec deux titres par souche (donc 6 modalités) et 2 brebis par modalité (12 brebis).

On a obtenu des mammites cliniques unilatérales pour les 12 brebis, dont 2 cas suraigus et un cas aigu pour THI56C, 9 cas subaigus pour les autres. SA9A est donc apparue moins pathogène que THI56A, et globalement moins pathogène que B29D, avec des différences modérées sur l'excrétion bactérienne, les comptages cellulaires et 7 critères cliniques (5 autres critères moins importants présentent des valeurs allant dans le sens contraire).

Le choix s'est finalement porté sur SA9A, souche hypovirulente, en particulier par rapport à THI56C. Le titre à inoculer est 10^3 UFC/mL ; avec 10^2 , l'excrétion était incertaine, et l'induction immunitaire et inflammatoire possiblement insuffisante.

1.3.3. Préparation des inoculums

Les cultures-mères ont été préparées en milieu relativement pauvre (eau peptonnée tamponnée). On les a laissées croître jusqu'en phase de plateau (onze heures). Les inoculums ont été préparés par dilutions décimales en sérum physiologique de $1,5$ à $1,8 \cdot 10^8$ jusqu'aux titres souhaités. Les préparations ont été maintenues dans de la glace pilée avant et après les dilutions.

1.4 - Inoculations

Un volume de 0,5 mL par seringue a été préparé à partir des cultures-mères, et inoculé par voie intra-citernale dans une des deux hémi-mamelles à l'aide de fins cathéters de 10 cm de long (sondes urinaires félines). Les titres suivants ont été utilisés :

- essai 1 : 10^3 UFC par hémi-mamelle (inoculation réalisée le matin de J0 avant la première traite),
- essai 2 : 15 UFC par hémi-mamelle (inoculation réalisée le soir de J0, donc J0 sera compté par la suite comme le dernier jour de pré-inoculation).

1.5 – Analyses bactériologiques

1.5.1. Vérification de l'absence d'infection préalable ou de co-infection

Trois séries d'analyses bactériologiques ont été réalisées avant inoculation afin de vérifier l'absence d'infection préalable.

Après inoculation, l'absence d'infection ou de co-infection a été vérifiée par ensemencement sur gélose au sang de mouton.

1.5.2. Dénombrement

Il a été réalisé au laboratoire de bactériologie du service de pathologie de reproduction de l'ENVT. La quantification de l'excrétion a été réalisée, après décongélation, par dilutions décimales en milieu de type en milieu de type BHI en micro-plaques, avec cinq répliques par lait (technique McCrady).

1.6 - Comptages cellulaires

Les comptages cellulaires ont été réalisés par la technique opto-fluoro-électronique au CIAL SO.

Les données ont été rassemblées dans des tableaux Excel. Nous avons travaillé en priorité sur les comptages des pots IIa et IIb, correspondant au lait de traite. Nous avons effectué les moyennes géométriques des comptages CCS pour les pots IIa et IIb. Quand ces valeurs de lait de traite manquaient (cas de production laitière insuffisante pour remplir quatre pots CCS), nous les avons remplacées artificiellement par une valeur de CCS de lait de premier jet. Nous avons effectué ensuite une transformation des CCS en SCS (scores des cellules somatiques), calculé comme suit, d'après la bibliographie :

$$SCS = \log_2(CCS/100\ 000) + 3,$$

où CCS est le nombre de cellules somatiques par mL.

2- Essai 1 : résultats

2.1 – Résultats cliniques

2.1.1. Clinique ante-mortem

2.1.1.1. Clinique aiguë et générale

Des signes aigus et généraux ont été observés uniquement chez les brebis du lot CCS-.

Dès J1, la brebis 4021 est trouvée couchée le matin, avec les oreilles basses, sans aucun entrain pour aller en salle de traite. Le lendemain, son état général est très mauvais, elle a même du mal à se déplacer, elle est rouge-rosée sur tout le corps. Sa mamelle est tendue et dure, il n'est pas possible de la traire. Le soir, il faut la prélever dans le box. Elle présente alors du ptyalisme, une dyspnée et polypnée, elle est en décubitus, ou pousse au mur lorsqu'on la fait se lever. Elle boîte également du postérieur gauche. Elle est retrouvée morte le lendemain matin (J3).

Les brebis CCS- 4030 et 4091 présentent une baisse d'état général le matin de J2, qui dure les jours suivants, avec une boiterie transitoire et des difficultés à se déplacer : elles montent difficilement toutes seules sur le quai de traite. Ces brebis ne mangent pas au retour de la traite, elles ont la tête et les oreilles basses, une d'elles présente une rhinite. A J5, les brebis 4091 et 4138 ne sont toujours pas en forme, elles grincent des dents. L'état général de la 4021 a empiré. Elle a de la diarrhée. Sa mamelle vire au violet (début de gangrène), de petites poches de liquide se sont formées par endroits. Les trayons sont violacés, très secs, avec de légères croûtes. Les brebis CCS-, contrairement aux brebis CCS+, présentent au bout de quelques jours une coloration plus marquée de la mamelle, plus particulièrement du côté inoculé (mais pas uniquement forcément) : le côté devient rose à rouge de façon marquée, voire violacé dans le cas de la 4030 qui développe une gangrène expansive. A J6, la 4091 a toujours des difficultés à se déplacer. La 4021 va mieux, on la trouve debout le matin. Cependant, on observe l'apparition d'une deuxième zone de gangrène sur la mamelle gauche (côté inoculé), de 2 cm de diamètre. La gangrène descend sur le traxon, qui est froid. La mamelle est chaude et œdémateuse en arrière à gauche. Le lendemain, la gangrène atteint le

bout du trayon et l'avant gauche de la mamelle. On observe à partir de ce jour un sillon disjoncteur.

Le matin de J8, la 4138, qui n'était pas en bon état général jusque-là, s'est assise puis est tombée en attendant la traite, on observe des écoulements hémorragiques au niveau de la vulve. Elle meurt une heure plus tard.

Les jours suivants, la brebis 4128 a des difficultés pour monter sur le quai de traite. La 4021, dont la mamelle gauche est toujours gangrenée, retrouve un comportement normal (elle attend sur le quai pour la traite, mange correctement). Le soir de J10, les brebis 4091 et 4128 sont les brebis avec l'état général le plus faible : elles sont couchées dans le box avant la traite. La 4128 est alors la seule à ne pas aller au râtelier après la traite. Elle ne mange pas le lendemain non plus, elle tient à peine sur ses pattes et il faut la lever. Elle est trouvée agonisante le matin de J12, couchée sur le flanc.

Ce jour-là, différentes zones de la mamelle de la brebis 4021 sont noires et sèches (avant de la mamelle, dessous de la mamelle, bout du trayon), des gouttes de sang s'écoulent de ces zones gangrenées. A J13, les suintements de sang à l'extrémité du trayon et sous la mamelle continuent, mais la brebis mange correctement, rumine, et monte seule sur le quai. A J14, on observe sur la mamelle un sillon disjoncteur net et marqué entre la zone saine et les zones gangrenées qui sont noires, très croûteuses et épaisses.

Toutes ces brebis du lot CCS- ont présenté une clinique aiguë, des signes d'intoxination (arthrites, diarrhée, affaiblissement général et signes qui en découlent : problèmes respiratoires...), l'inoculation a eu des conséquences expéditives pour 3 brebis sur 5 qui sont mortes brutalement après une baisse marquée de l'état général.

Si on étudie les moyennes géométriques des températures (matin et soir) lot par lot, on constate que les brebis CCS- ont eu en moyenne et de manière régulière une température supérieure à la température moyenne des brebis CCS+. Cette différence est significative après l'inoculation (student $2,47 \cdot 10^7$). La différence de température moyenne entre les deux lots est également significative avant l'inoculation (student $4,93 \cdot 10^4$).

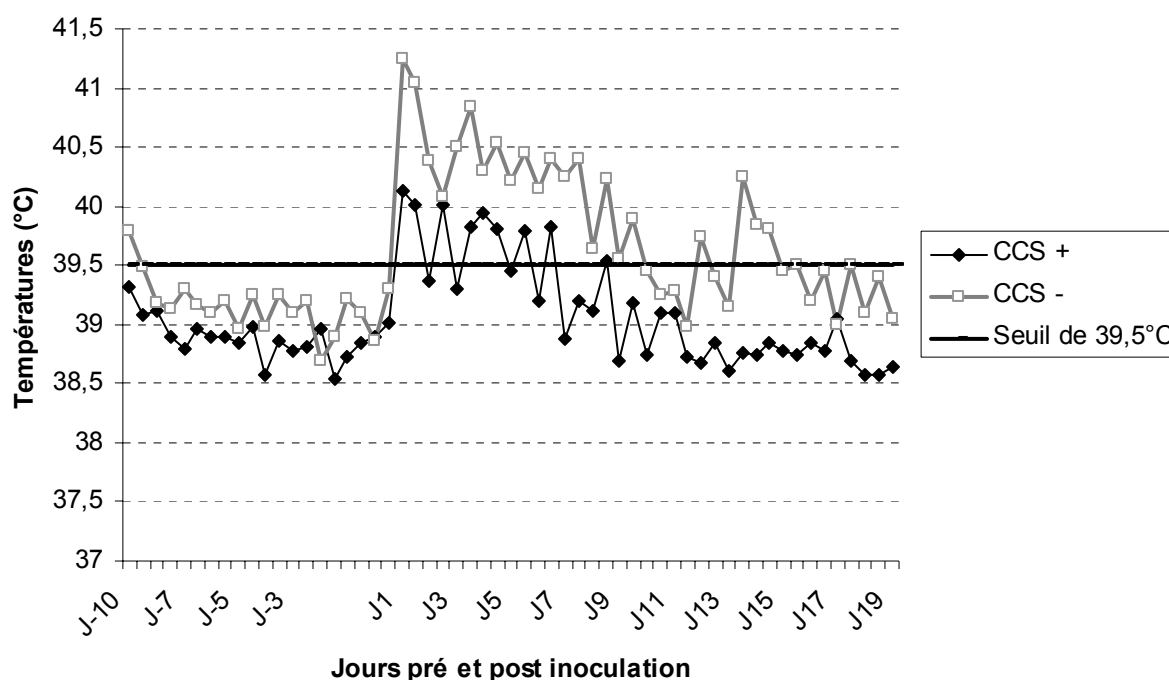


Figure 3 : Courbes des températures en moyennes géométriques par lot (essai 1)

Si on fixe un seuil de température de 39,5°C (considéré comme un seuil d'hyperthermie chez les brebis), on constate que les températures moyennes ne dépassent pas ce seuil avant inoculation, sauf le premier jour chez les CCS- (cela peut être dû au changement de milieu, au stress de l'arrivée dans un endroit inconnu...). Par la suite, 10 moyennes de températures sur 57 (matin ou soir) dépassent ce seuil chez les CCS+, contre 29 sur 57 chez les CCS-. A partir de J9 chez les CCS+, les températures moyennes ne dépassent plus ce seuil, ce qui n'est pas le cas pour les CCS-.

On a statistiquement une différence significative entre les deux lots, montrant une température moyenne plus élevée chez les brebis CCS-.

2.1.1.2. Clinique chronique : signes locaux

Les brebis du lot CCS+ ont présenté une clinique plus localisée, moins aiguë. Deux d'entre elles (4112, 4154) sont abattues le jour suivant l'inoculation. A part la 4076, les quatre autres (4093, 4096, 4112, 4154) sont les seules des deux lots à continuer à manger normalement à J3 et à rejoindre le râtelier immédiatement après la traite. A de rares

exceptions près, ce seront jusqu'à la fin de l'expérimentation les quatre premières à monter sur le quai de traite.

Ces brebis CCS+ n'ont pas développé de gangrène. Le tableau de notes cliniques concernant les abcès met en évidence de façon nette que les quartiers inoculés de ces brebis présentent des abcès, petits ou gros, et de nombre variable à partir de J3 pour la 4076 mais surtout à partir de J5, et de manière régulière jusqu'à la fin de l'expérimentation.

2.1.1.3. Notes cliniques mammaires

Pour les brebis de l'essai 1, on obtient les courbes de notes cliniques ci-dessous sur la figure 4, côté par côté et lot par lot.

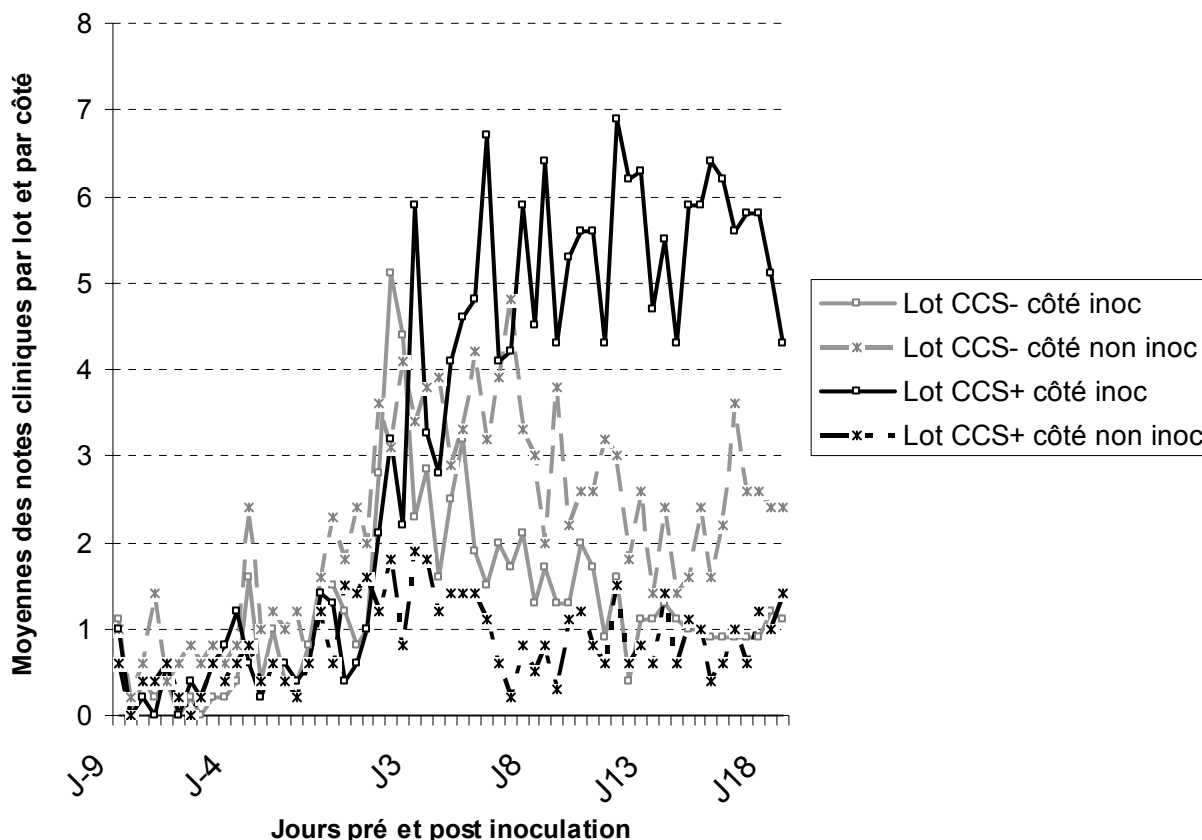


Figure 4 : Notes cliniques des brebis de l'essai 1 côté par côté et lot par lot

Comme la lecture des fiches cliniques sur la durée de l'expérience le laissait supposer, les brebis du lot CCS+ ont eu des notes cliniques significativement plus élevées pour les côtés inoculés que pour les côtés non inoculés après inoculation (student $6,95 \times 10^{-14}$). Avant

inoculation, la moyenne des notes cliniques est semblable entre les deux lots (student 0,18). Cependant, cette différence significative met bien en relief ce qui a été décrit dans les paragraphes précédents : l'expression clinique a été significativement différente entre les lots CCS+ et CCS-. **Les brebis CCS+ ont eu de manière significative une clinique plutôt chronique**, caractérisée par des abcès, une induration de la mamelle, des nœuds lymphatiques du côté inoculé augmentés de volume...

2.1.2. Résultats d'autopsie

2.1.2.1. Brebis mortes en cours d'expérimentation

La première autopsie a été réalisée le 14 mars suite à la mort de la brebis 4021 appartenant à la lignée CCS-, retrouvée morte le matin du 14. La mamelle présentait un fort œdème sous-cutané. Le parenchyme montrait une forte inflammation (très rouge) surtout du côté gauche, le côté inoculé, mais également à droite. A gauche, on trouvait un seul nœud lymphatique rétro-mammaire, avec une très forte augmentation de volume, et à droite, 4 nœuds lymphatiques, avec un volume augmenté pour certains. Les nœuds lymphatiques iliaques droits et gauches étaient hémorragiques, et leur volume augmenté. Il y avait des pétéchies sur le cœur. La peau présentait une rougeur des deux côtés, il ne s'agissait donc pas d'une rougeur liée à la position post-mortem. Une bactériologie et une histopathologie ont été effectuées sur deux nœuds lymphatiques rétro-mammaires. Des histopathologies sont également réalisées sur du parenchyme sécrétoire, du parenchyme de la zone citernale, et des nœuds lymphatiques iliaques.

La brebis 4138 de la lignée CCS- est morte le 19 mars. Elle s'est assise puis est tombée au moment de la traite du matin, des écoulements sanguinolents étaient présents à la vulve.

Le 19 mars (J8), la brebis 4128 de la lignée CCS- est morte également. Elle a été autopsiée. Elle présentait une diarrhée importante, une demi-mamelle droite violacée, de ulcères sur la caillette mais rien d'autre au niveau du tube digestif. La médullaire du nœud lymphatique rétro-mammaire gauche était brunâtre, le nœud lymphatique droit présentait une infiltration cellulaire et de légers points hémorragiques. Le parenchyme mammaire gauche était légèrement inflammé, et le droit était induré, avec de multiples petits abcès. Le nœud lymphatique iliaque droit était plus gros que le gauche. Cette brebis avait été inoculée dans la demi-mamelle droite.

2.1.2.2. Brebis euthanasiées en fin d'expérimentation

Les sept brebis restantes ont été euthanasiées et autopsiées le 30 mars.

Des prélèvements bactériologiques et des prélèvements en vue d'une histopathologie sont réalisés sur les nœuds lymphatiques rétro-mammaires et iliaques. D'autres prélèvements en vue d'une histologie sont effectués sur le parenchyme citernal et alvéolaire.

Concernant l'état général des brebis, la brebis 4030 de la lignée CCS- a un état d'engraissement très mauvais, et la brebis 4154 de la lignée CCS+ un état d'engraissement médiocre. Chez la brebis 4030 (lot CCS-), l'autopsie met aussi en évidence une bronchopneumonie (le lobe crânial droit du poumon présente une densification), une rate assez grosse, des micro abcès nombreux sur le foie, de 1 à 2 mm de diamètre.

Les tableaux 4 et 5 ci-dessous et page suivante donnent les résultats d'autopsie pour les brebis des deux lignées, en indiquant :

- * le poids et l'aspect des nœuds lymphatiques (NL) rétro-mammaires (dans le cas où on a trouvé plusieurs nœuds lymphatiques, leur nombre et le poids total de ces nœuds lymphatiques pour le côté concerné sont indiqués),
- * l'aspect du parenchyme mammaire, côté droit et côté gauche (N : normal),
- * l'aspect des nœuds lymphatiques iliaques, à droite et à gauche (IC = Infiltration Cellulaire, CH = corticale hémorragique).

Tableau 4 : Résultats d'autopsie des brebis CCS- (lignée basse) de l'essai 1

Brebis CCS - (côté inoculé)	Nœuds lymphatiques rétro- mammaires		Parenchyme mammaire		Nœuds lymphatiques iliaques	
	Gauches	Droits	Gauche	Droit	Gauche	Droit
4091 (gauche)	53,7 g (3NL) IC pour un Corticale et/ou médulla hémorragique	19,1 g Médulla légèrement hémorragique	Augmentation de l'épaisseur du tissu conjonctif sous cutané Intérieur nécrotique	N	Gauche beaucoup plus gros et plus hémorragique que le droit	
4030 (gauche)	14,9 g (3NL)	19,1 g (2NL dont un avec CH)	Gangrène Disjonction réalisée complètement	N	N	Plus gros CH Médulla hémorragique
4128 (droit)	Médulla brunâtre	IC Légers points hémorragique s	Légère inflammation	Induration Petits abcès multiples	Droit plus gros que le gauche	

NL : Nœud Lymphatique
 IC : Infiltration Cellulaire
 CH : Corticale Hémorragique
 N : Normal

Tableau 5 : Résultats d'autopsie des brebis CCS+ (lignée haute) de l'essai 1

Brebis CCS + (côté inoculé)	Nœuds lymphatiques rétro- mammaires		Parenchyme mammaire		Nœuds lymphatiques iliaques	
	Gauches	Droits	Gauche	Droit	Gauche	Droit
4112 (droit)	4,4 g Corticale hémorragique	14,6 g : 4 NL dont 2 à corticale hémorragique	Pas de différence notable Aspect normal Quelques abcès en zone basse		Plus gros à droite qu'à gauche Hémorragiques, surtout à droite	
4093 (droit)	11,2 g Infiltration cellulaire	32,2 g Corticale hémorragique	N	Plus dur Petits abcès en périphérie Travées conjonctives augmentées	Plus gros que le droit	CH IC
4096 (droit)	5,4 g 21 g (3NL) Corticale très hémorragique et infiltration cellulaire des deux côtés		N	Consistance augmentée, Petits abcès multiples palpables mais non visibles	Gauche plus gros que droit, Infiltration cellulaire Corticale hémorragique (et médullaire hémorragique à gauche)	
4154 (droit)	3,05 g : 2 NL Corticale hémorragique pour l'un, normale pour l'autre	16,7g : 2 NL Corticales hémorragique à très hémorragique	N	N	IC (dans un des 2 : follicules inflammatoir es touchant corticale et médulla	CH Légères tâches d'infiltration cellulaire dans la médulla
4076 (gauche)	33,5 g Corticale hémorragique	5,5 g Aspect normal	Plus dur, Petits abcès en zone haute, Gros abcès en zone basse	N	CH et médulla hémorr.	Plus gros qu'à gauche, hémorragie corticale

NL : Nœud Lymphatique
IC : Infiltration Cellulaire
CH : Corticale Hémorragique
N : Normal

Pour les brebis CCS + :

Poids moyen des nœuds lymphatiques du côté inoculé (moyenne arithmétique) : 23,6 g.

Poids moyen des nœuds lymphatiques du côté non inoculé (moyenne arithmétique) : 5,9 g.

2.2 – Production laitière

Les quatre premiers jours de traite (de J-10 à J-7 inclus) ont été supprimés pour tenir compte du temps d'adaptation des brebis suite à leur transfert du domaine de La Fage à l'ENVIT. Par la suite, pour les brebis mortes ou présentant une gangrène ou ne produisant plus rien, on a noté pour les calculs de productions moyennes et de ratios de production qu'elles produisaient 1mL de lait résiduel.

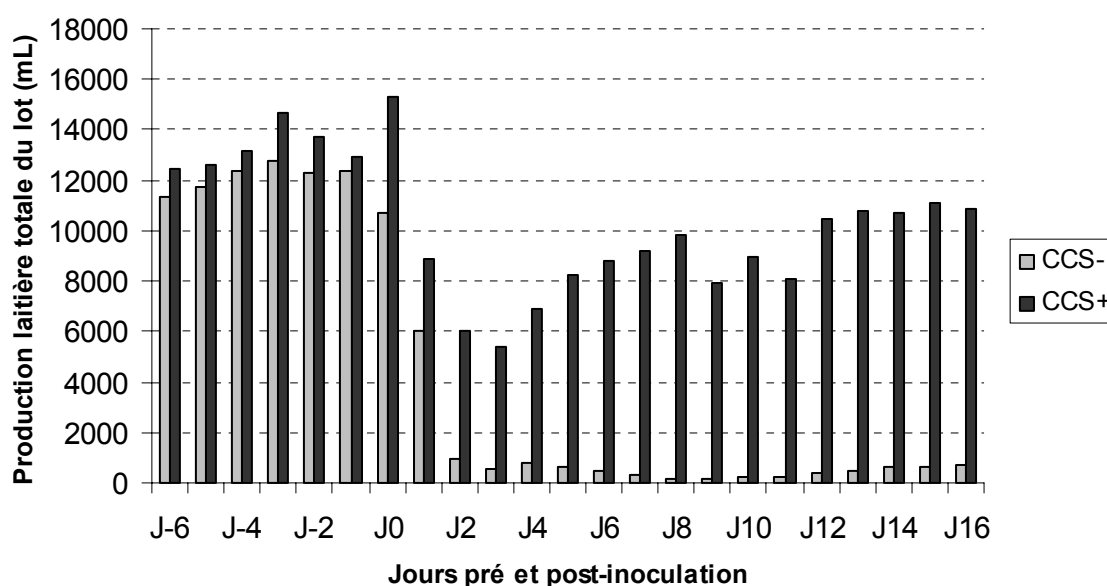


Figure 5 : Production laitière totale de chaque lot de l'essai 1

Après quelques jours, les brebis CCS- encore vivantes ne produisaient plus de lait. Trois de ces brebis sont mortes, d'où des résultats de production quasiment nuls pour l'ensemble du lot.



Les moyennes géométriques des productions laitières quotidiennes de chaque lot (demi-mamelles inoculées et non inoculées) sont représentées sur la figure 6 ci-après.

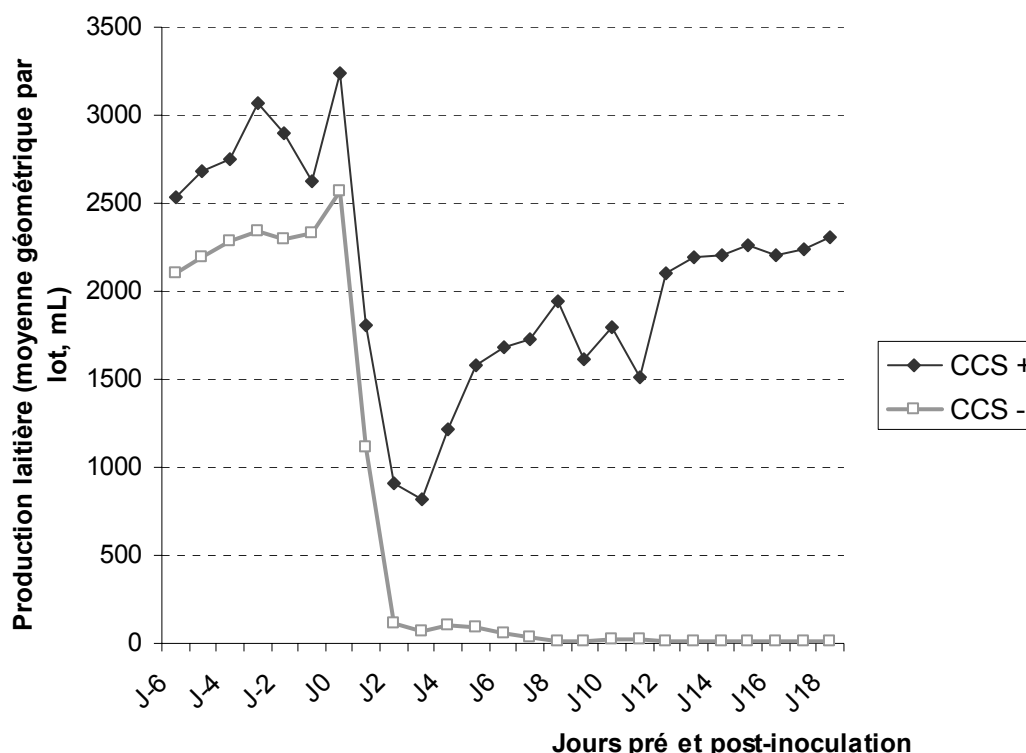


Figure 6 : Moyennes géométriques des productions laitières quotidiennes de chaque lot de l'essai 1 (demi-mamelles inoculées et non inoculées)

On constate une chute significative de la production après inoculation. Du fait des trois brebis mortes dans le lot CCS- et des autres qui ne produisaient plus de lait après quelques jours, la différence entre les deux lots est marquante. Pour les brebis CCS+, après une chute de production, la moyenne de production remonte après J4, et atteint à la fin de l'expérience une valeur seulement sensiblement inférieure à la moyenne au début de l'expérience, avant inoculation.

Il a été montré qu'après inoculation, le côté non inoculé produit plus de lait que le côté inoculé, pour compenser la production. Afin de contourner ce problème, on a tracé le ratio suivant : la moyenne géométrique par lot de la production laitière du côté inoculé sur la moyenne géométrique de la production laitière des deux côtés avant inoculation.

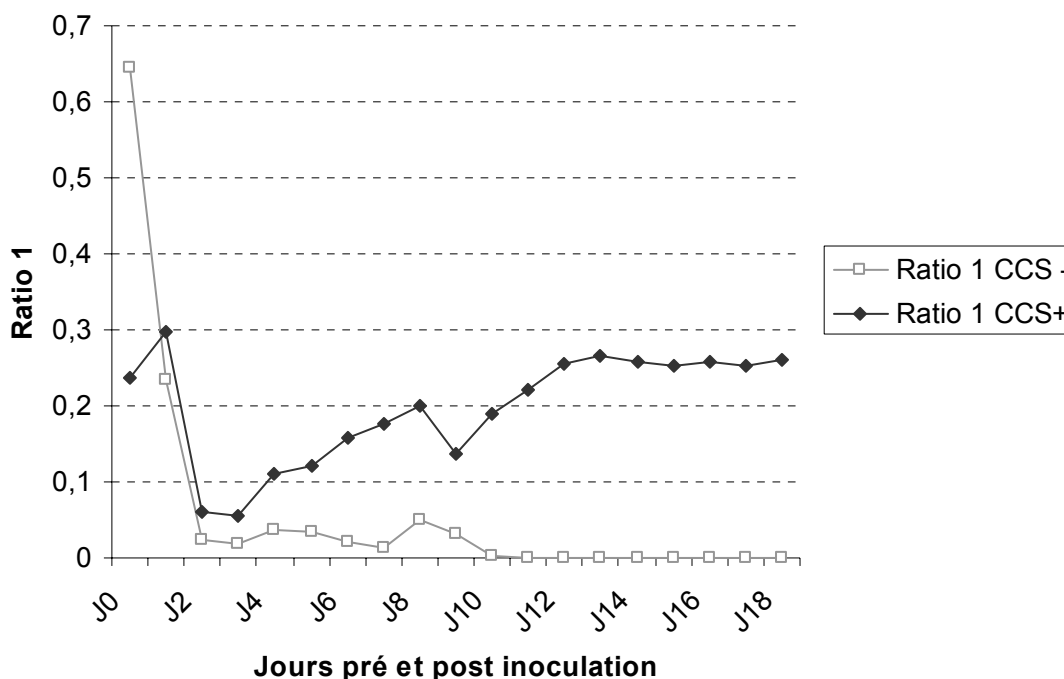


Figure 7 : Ratio de la moyenne géométrique de la production laitière du côté inoculé à la moyenne géométrique de la production laitière des deux côtés avant inoculation (essai 1)

2.3 – Comptages cellulaires

Les données ont été rassemblées dans des tableaux Excel. Nous avons travaillé en priorité sur les comptages des pots IIa et IIb, correspondant au lait de traite. Nous avons effectué la moyenne géométrique des comptages CCS pour les pots IIa et IIb pour chaque brebis. Pour les brebis CCS- n°4021, 4030 et 4091, nous n'avons aucune valeur CCS à partir de J1 au soir, même si parfois la production laitière était suffisante pour remplir 4 pots CCS, l'échantillon était en mauvais état, ou dégradé, ou caillé, donc non interprétable par le CIAL SO. Nous avons effectué la moyenne géométrique de ces CCS par côté et par lot quand les valeurs existaient.

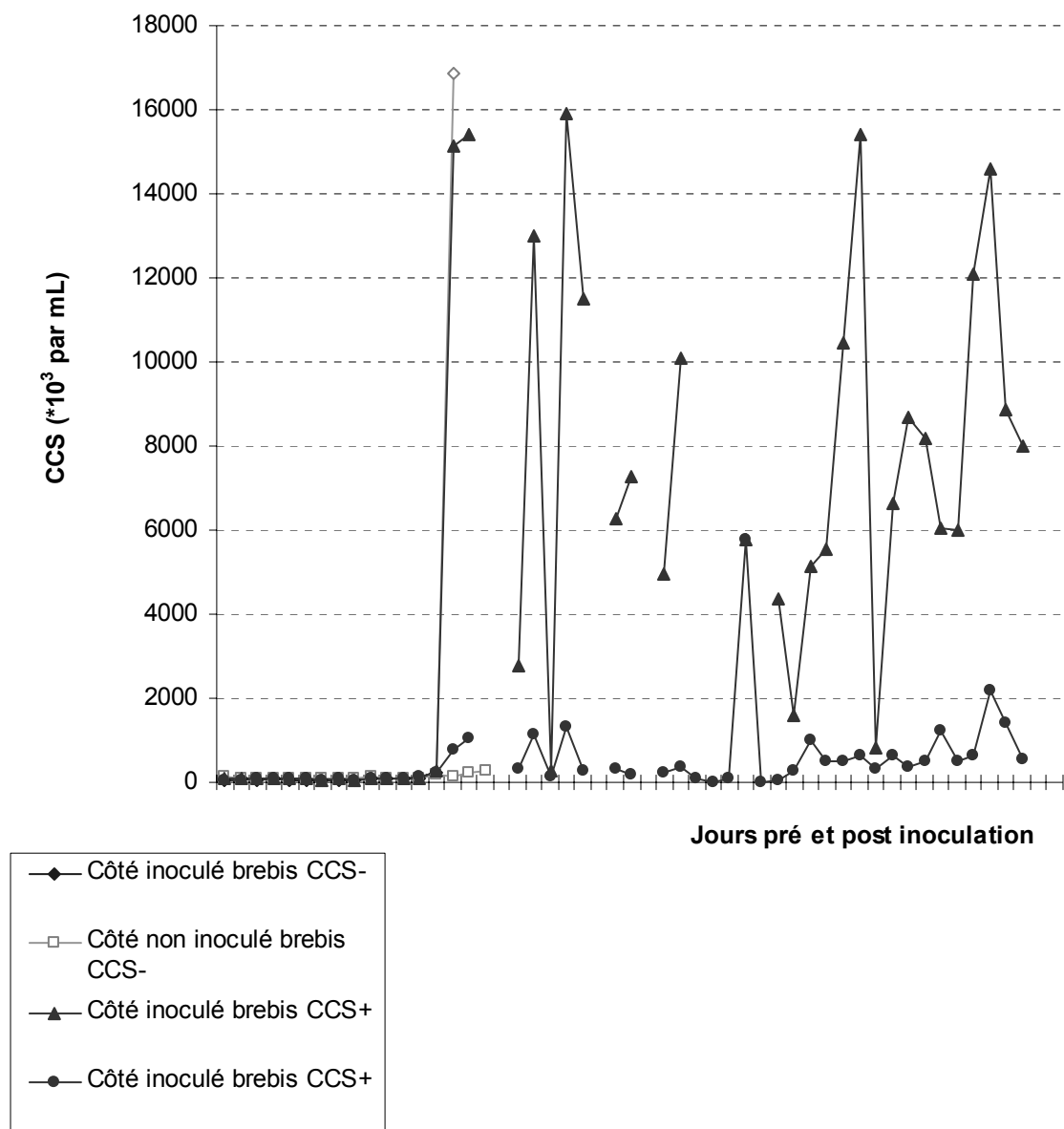


Figure 8 : Moyennes géométriques des comptages de cellules somatiques (CCS) par côté et par lot (essai 1)

Les scores des cellules somatiques sont tracés à partir des données obtenues (Figure 8).

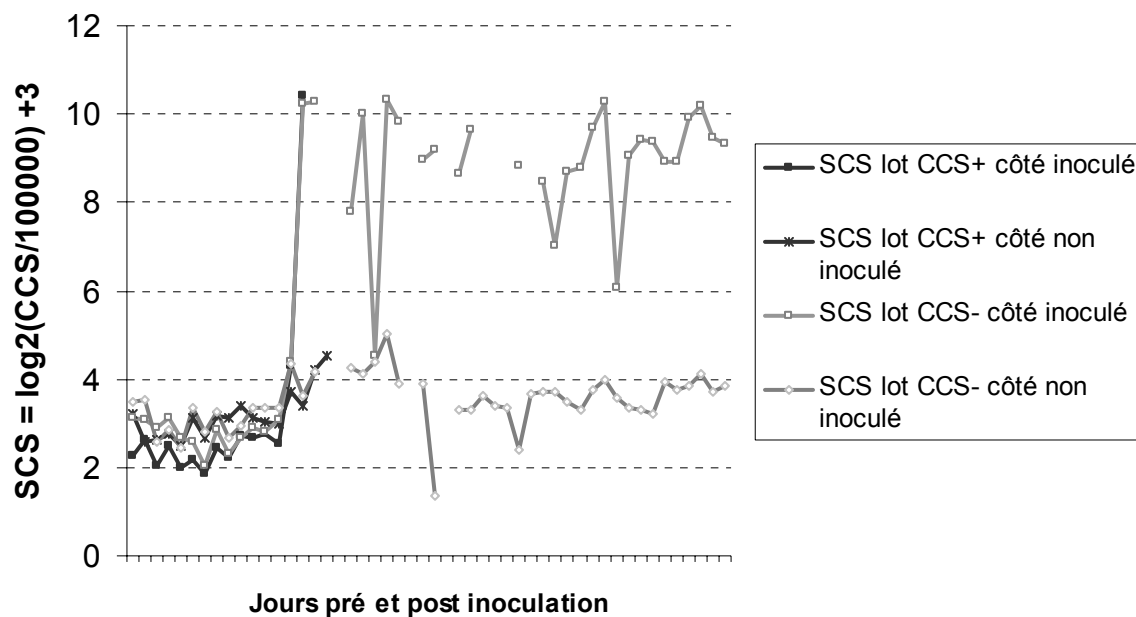


Figure 9 : Scores des cellules somatiques (SCS) moyens par côté et par lot lors de l'essai 1

2.4 - Bactériologie

Nous n'avons que sept résultats de dénombrements bactériens disponibles après inoculation, ceci est dû à la production laitière quasi nulle des brebis, et à la mort de trois d'entre elles, qui fait que les résultats restants sont difficilement utilisables pour comparer les deux lignées.

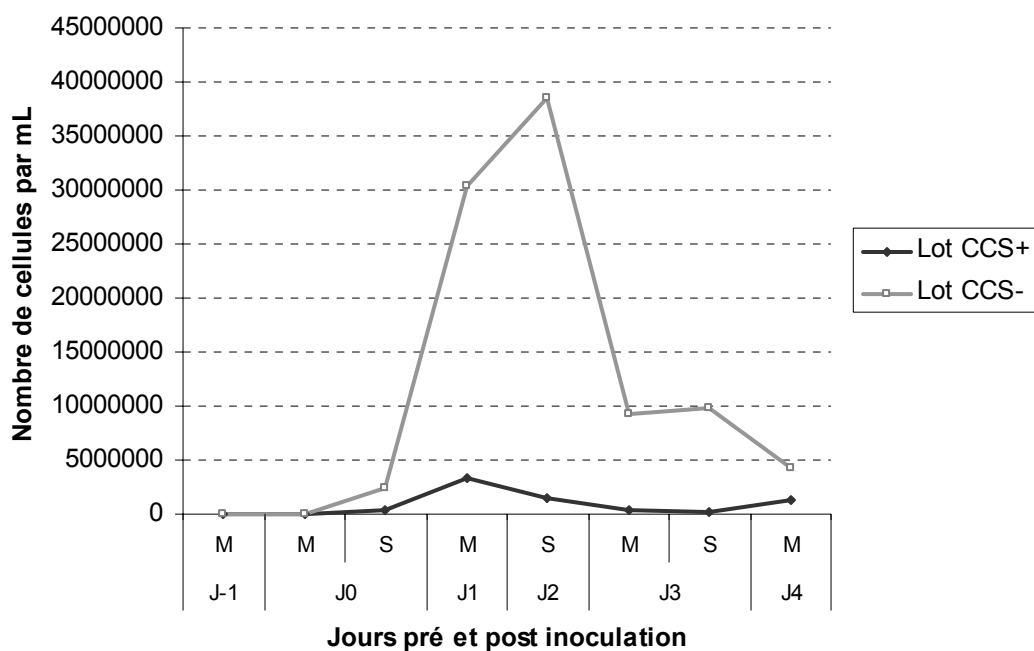


Figure 10 : Excrétion bactérienne moyenne géométrique par lot (essai 1)

Ces résultats sont des moyennes géométriques par lot. Il existe une différence significative (student 0,039) entre les deux lots. L'excrétion bactérienne est nettement plus importante pour le lot CCS-, avec un pic d'excrétion le soir de J2, qui correspond au pic de température observé aussi ce soir là. Pour le lot CCS+, on observe aussi un pic, plus aplati et plus précoce dans la journée de J1.

3- Essai 2 : résultats

3.1 – Résultats cliniques

3.1.1. Clinique ante-mortem

3.1.1.1. Clinique aiguë et générale

Une seule brebis a présenté des signes de clinique aiguë, de façon assez retardée après l'inoculation par rapport aux brebis de l'essai 1 : il s'agit de la 4039, du lot CCS+. Le jour suivant l'inoculation, le nœud lymphatique rétro-mammaire du côté inoculé était très réactionnel comparé à ceux des côtés inoculés des autres brebis. A J5, elle a commencé à tousser par quintes (trois fois en trois-quarts d'heures à la traite du soir), une rougeur de la mamelle apparue la veille remonte en région périnéale, sous la queue, et s'étend sur tout le corps. Elle tarde à se lever le soir de J6, elle est abattue, et elle est rosée partout (même sur la tête). Les jours suivants, elle est la seule à ne pas se lever spontanément, son état général n'est pas bon, elle maigrit. Elle présente des symptômes de néphrite hémorragique le soir de J7 (urine rouge). Le matin de J8, elle est couchée, respire difficilement, urine toujours du sang, présente du ptyalisme. Une zone violacée est apparue en avant de la mamelle. Elle meurt à 9h ce matin-là.

3.1.1.2. Clinique chronique : signes locaux

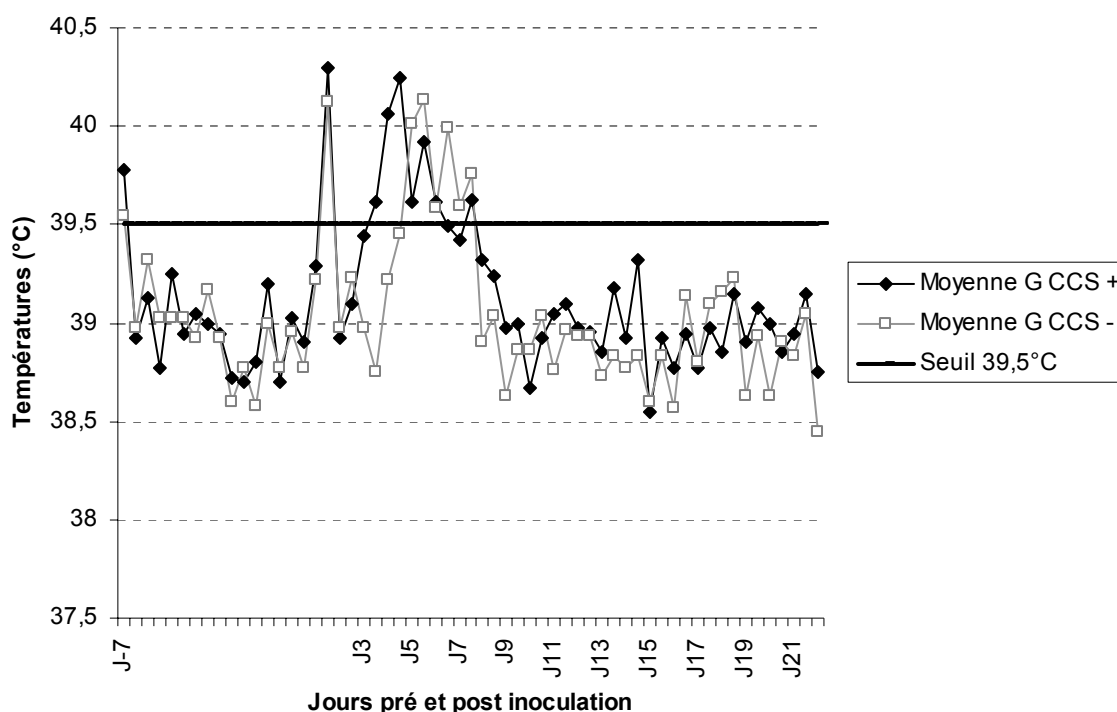
Pour les autres brebis, les mammites sont de type subaigu pour les CCS- et subclinique pour les CCS+.

On n'observe pas de clinique générale particulière sur aucune brebis après l'inoculation le soir de J0. A J2, les brebis continuent de s'alimenter correctement : il n'y a plus de foin dans le râtelier avant la traite ; après la traite, toutes vont au râtelier, sauf la 4111. Trois brebis CCS+ et une brebis CCS- ont plus ou moins mangé leur concentré, les autres l'ont entièrement mangé. Le soir de J3, toutes vont au râtelier après la traite sauf la 4105. A J4, la 4051 et la 4039 ne mangent pas après la traite, alors qu'elles ont mangé leur concentré correctement.

Après la traite du matin de J5, les brebis 4039, 4051, 4113, 4105 et 4106 se couchent (la 4105 rumine), tandis que les brebis 4111, 4077 et 4102 mangent du foin.

Après la mort de la brebis 4039 à J8, on n'observe pas jusqu'à la fin de l'expérience de modifications de l'état général sur les autres brebis : qu'elles soient du lot CCS+ ou CC6, elles ont un état général normal, elles continuent de s'alimenter correctement, et l'aspect du lait est normal à partir de J8.

Si on représente les moyennes géométriques des températures lot par lot, on obtient les courbes suivantes sur la figure 12.



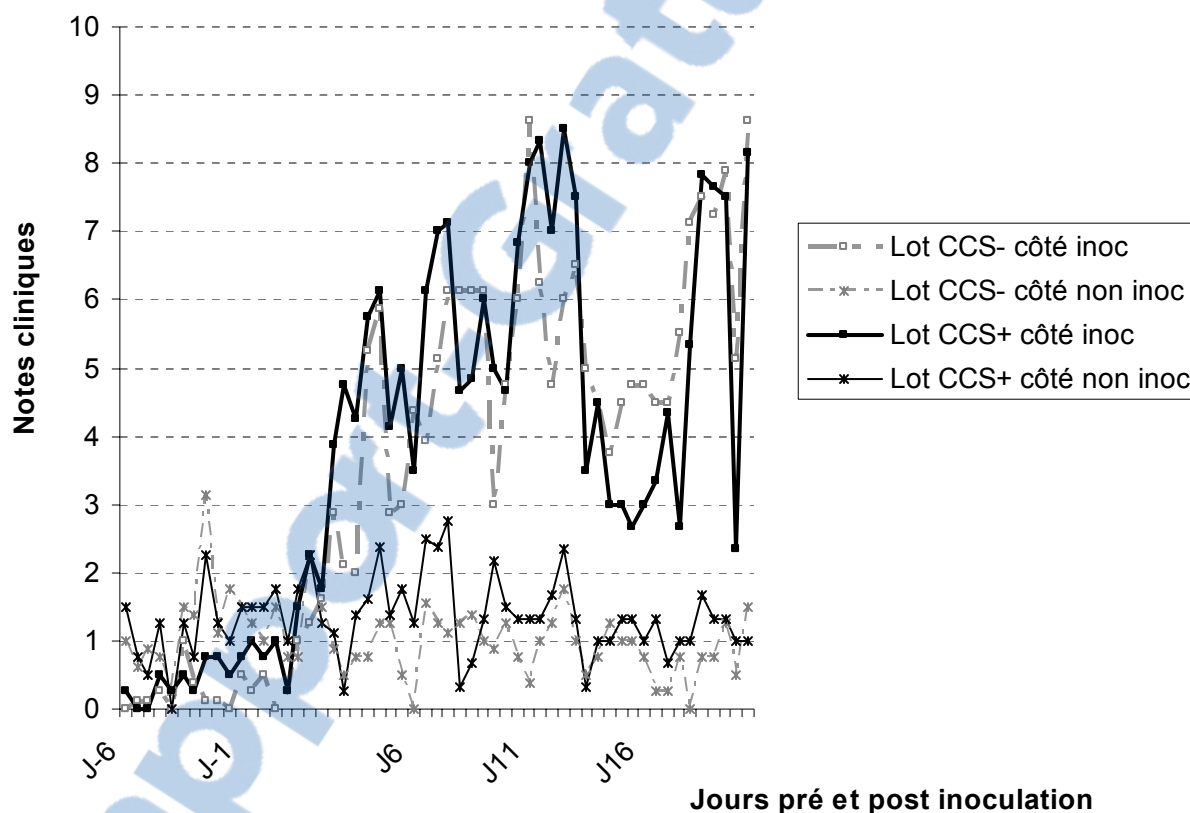
(huit brebis jusqu'à J8, sept brebis ensuite après la mort de la brebis 4039 du lot CCS+)

Figure 11 : Courbes des températures en moyennes géométriques par lot (essai 2)

Il n'existe pas de différence significative entre les deux lots, ni avant ni après inoculation. Le test de Student donne un résultat de 0,8644 avant inoculation et de 0,2005 après inoculation. 9 valeurs de température sur 59 dépassent le seuil de 39,5°C chez les CCS+, et 10 sur 59 chez les CCS-. Une fois de plus ici, la différence entre les deux lots concernant les températures n'est pas significative.

On observe deux pics de températures : le soir suivant l'inoculation, puis quelques jours plus tard, avec ce deuxième pic décalé de deux traites pour les CCS-. On observe un nadir entre les deux pics : de J2 à J 3 pour les CCS+ et de J2 à J5 pour les CCS-, les températures moyennes redescendent en dessous du seuil de 39,5°C.

Des signes cliniques locaux existent cependant (modification de la couleur de la mamelle, déséquilibre de la mamelle avant la traite, augmentation de taille des nœuds lymphatiques...). Ils sont décrits par la note clinique, dont les moyennes lot par lot et côté par côté (inoculé - non inoculé) sont représentées sur la Figure 12.



(huit brebis jusqu'à J8, sept brebis ensuite après la mort de la brebis 4039 du lot CCS+)

Figure 12 : Notes cliniques des brebis de l'essai 2 côté par côté et lot par lot

Les notes cliniques sont significativement différentes entre le côté inoculé et le côté non inoculé pour chaque lot (student $8,87 \times 10^{-11}$) : on a deux groupes bien distincts de deux courbes après l'inoculation, avec des moyennes de notes cliniques nettement moins élevées pour les côtés non inoculés. Les courbes étaient beaucoup plus mélangées lors de l'essai 1. Les notes cliniques du côté inoculé sont fluctuantes et assez proches pour les 2 lots, il n'existe pas de différence significative entre la clinique des côtés inoculés des brebis CCS- et des brebis CCS+ (student 0,716). Il existe une différence significative entre les notes cliniques des côtés non inoculés selon le lot (student 0,0033).

3.1.2. Résultats d'autopsie

3.1.2.2. Brebis morte en cours d'expérimentation

La brebis 4039 est morte le matin du 20 avril 2005 pendant la séance de traite. Elle avait présenté de l'hématurie les jours précédents. Elle présente un ictère généralisé.

Cette brebis avait été inoculée à droite. Les nœuds lymphatiques rétro-mammaires (un à gauche et deux à droite) sont tous très hémorragiques et de manière homogène. Le parenchyme mammaire est hémorragique de façon homogène à droite et légèrement hémorragique seulement à gauche. Les nœuds lymphatiques iliaques sont très réactionnels, fortement hémorragiques, et présentent une infiltration cellulaire. Les reins sont tous deux hémorragiques et de façon homogène, le rein gauche est gros. On observe de plus une pyélonéphrite. La vessie en elle-même ne présente pas d'anomalie, mais l'urine qu'elle contient est rouge. La rate est sombre (noire) et friable, le foie et le poumon ne montrent pas d'anomalies.

3.1.2.2. Brebis euthanasiées en fin d'expérimentation

Les sept brebis restantes sont euthanasiées et autopsiées le 3 mai.

Des prélèvements bactériologiques et des prélèvements en vue d'une histopathologie sont réalisés sur les nœuds lymphatiques rétro-mammaires et iliaques (gauches et droits). D'autres prélèvements en vue d'une histopathologie sont effectués sur le parenchyme profond et cisternal, et sur les trayons. Les tableaux 6 et 7 des deux pages suivantes donnent les résultats d'autopsie pour les brebis des deux lignées, en indiquant :

- * le poids et l'aspect des nœuds lymphatiques (NL) rétro-mammaires (dans le cas où on a trouvé plusieurs nœuds lymphatiques, leur nombre et le poids total de ces nœuds lymphatiques pour le côté concerné sont indiqués),
 - * l'aspect du parenchyme mammaire, côté droit et côté gauche (N : normal),
 - * l'aspect des nœuds lymphatiques iliaques, à droite et à gauche (IC = Infiltration Cellulaire, CH = corticale hémorragique).
- L'autopsie ne révèle rien de particulier sur les autres organes.

Tableau 6 : Résultats d'autopsie pour les brebis CCS – (lignée basse) de l'essai 2 :

Brebis CCS - (côté inoculé)	Nœuds lymphatiques rétro-mammaires		Parenchyme mammaire		Nœuds lymphatiques iliaques	
	Gauches	Droits	Gauche	Droit	Gauche	Droit
4105 (gauche)	15,8 g (3 NL dont un à IC)	5,4 g (2NL)	Consistance augmentée, Multiples petits abcès	N	7 g IC corticale	7 g IC corticale
4106 (gauche)	8 g N	26 g IC CH	N	Rares plages de parenchyme de couleur et de consistance différentes	4,5 g CH IC	10,4 g (2 NL) CH
4077 (gauche)	20 g IC	9,5 N	3 abcès de 5 mm de diamètre et 1 en position kystique, des zones de parenchyme blanchâtres (fibrose ?), Quelques abcès miliaires	N	3,3 g Pas de lésions	9,9 g
4051 (gauche)	28 g CH et médulla hémorragi ques	6,5 g	Quelques abcès de 2 à 8 mm de diamètre, Abcès miliaires, Induration, Couleur terne	N	6,1 g CH et médulla hémorragiq.	1,4 g CH

NL : Nœud Lymphatique
IC : Infiltration Cellulaire
CH : Corticale Hémorragique
N : Normal

Tableau 7 : Résultats d'autopsie pour les brebis CCS+ (lignée haute) de l'essai 2

Brebis CCS + (côté inoculé)	Nœuds lymphatiques rétro- mammaires		Parenchyme mammaire		Nœuds lymphatiques iliaques	
	Gauches	Droits	Gauche	Droit	Gauche	Droit
4102 (droit)	8,2 g (2NL) IC	18,8 g (4NL) 2 NL normaux IC importantes et CH sur les autres	N	Consistance normale, 4 petits abcès de 1 à 3 cm de diamètre	3,7 g IC CH	4,3 g IC importante
4113 (droit)	5,3 g IC CH	14,8 g (2NL) IC	N	Consistance légèrement augmentée, Quelques abcès	3,9 g IC	4,9 g IC CH
4111 (gauche)	20 g IC	9,5 g Normal	Légère fibrose, 1 abcès, kystes purulents	N	3,7 g IC	0,4 g Normal

NL : Nœud Lymphatique
IC : Infiltration Cellulaire
CH : Corticale Hémorragique
N : Normal

3.2 – Production laitière

Comme pour les résultats de l'essai 1, nous avons tracé l'histogramme de la production laitière de chaque lot (figure 13).

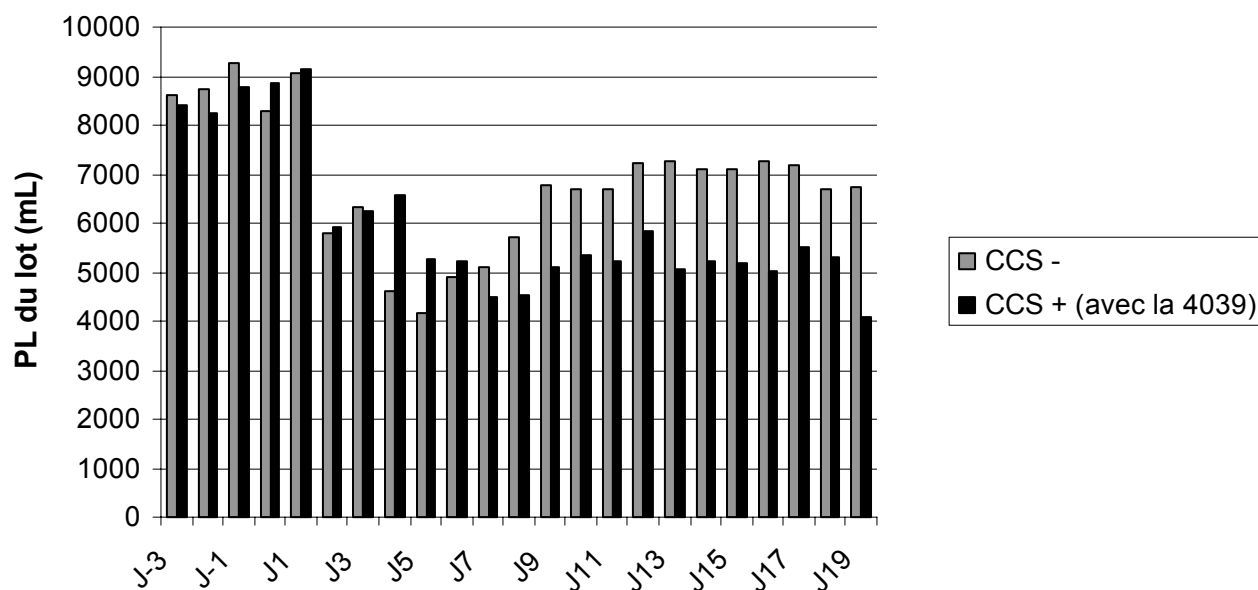


Figure 11 : Production laitière totale de chaque lot (essai 2)

Les productions des deux lots se suivent de près jusqu'à J8 où on observe une production totale moindre pour le lot CCS+, liée à la mort de la brebis 4039 à J8.

Si on représente les moyennes géométriques des productions laitières totales (côté inoculée + côté non inoculé) (figure 14), on obtient des courbes significativement différentes entre les lots CCS+ et CCS- si on compte dans les moyennes la production de la brebis 4039 : on lui compte une production quotidienne résiduelle de 1mL matin et soir pour pouvoir l'inclure dans les moyennes après sa mort. Si on n'inclut pas du tout la brebis 4039 dans les moyennes à aucun moment de l'expérience, on obtient des moyennes sans différences significatives entre les deux lots (student 0,687).

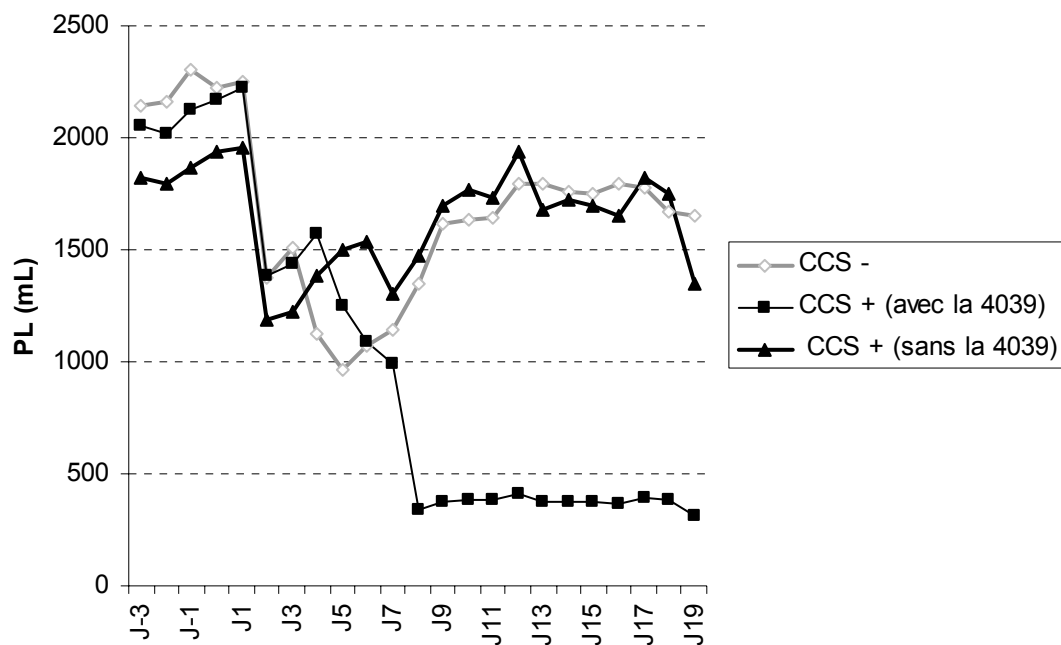


Figure 12 : Moyennes géométriques des productions laitières des deux côtés par lot (essai 2)

Maintenant, si on étudie les productions laitières séparées du côté inoculé et du côté non inoculé, on obtient les courbes suivantes :

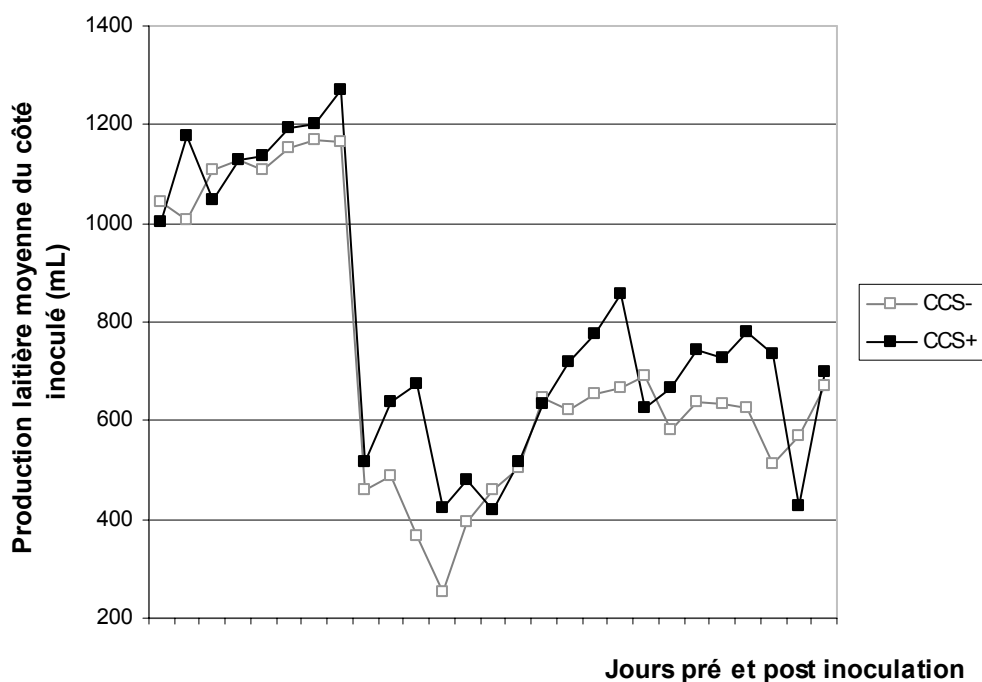


Figure 13 : Production laitière moyenne du côté inoculé (moyenne arithmétique) (essai 2)

Du côté inoculé, il n'y a pas de différence significative concernant la production laitière entre les brebis CCS- et les brebis CCS+ ni après inoculation, ni avant d'ailleurs (student avant inoculation 0,508, student après inoculation 0,149).

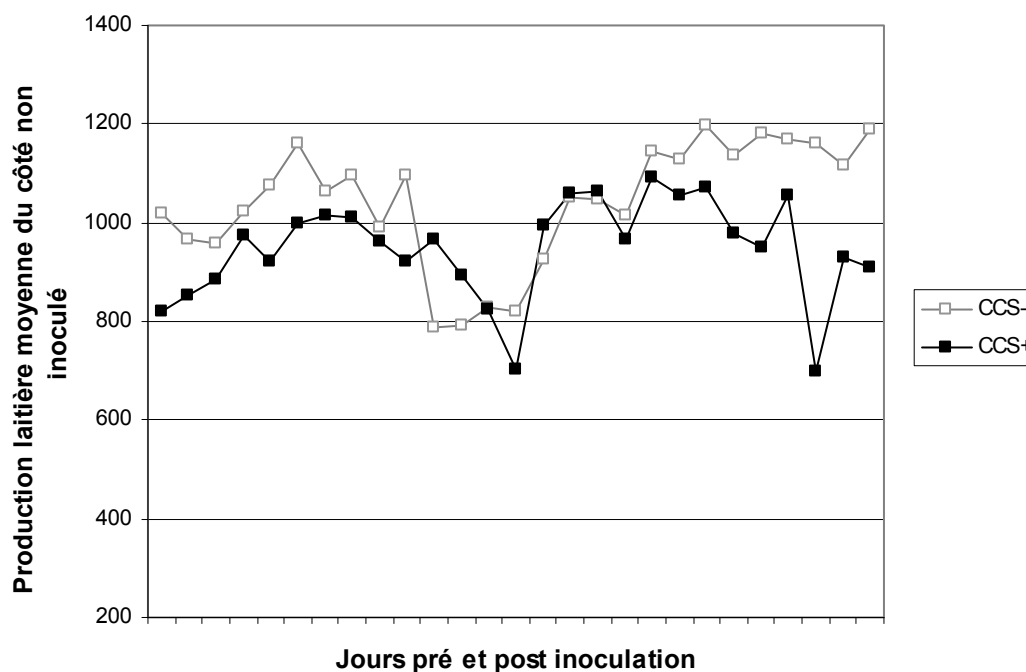


Figure 14 : Production laitière moyenne du côté non inoculé (moyenne arithmétique) (essai 2)

Du côté non inoculé, le test de Student entre la production laitière moyenne du lot CCS- et celle du lot CCS+ montre que la différence n'est pas significative entre les deux productions (student 0,03). On trouve un résultat de 0,01 pour le test de Student entre les deux lots *avant* inoculation : la différence est alors significative, mais elle est compensée après inoculation.

Enfin, nous avons représenté le même ratio que lors de l'essai 1, toujours pour contourner le problème d'interprétation lié au fait que, après inoculation, le côté non inoculé produit plus que le côté inoculé. Les résultats correspondant sont représentés sur la figure 17.

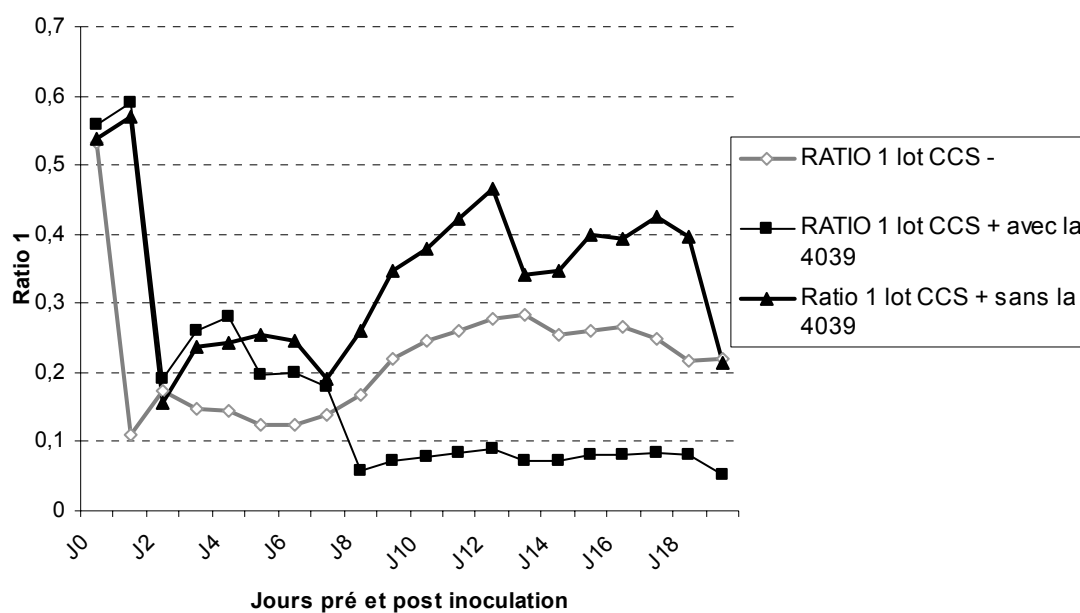


Figure 15 : Ratio de la moyenne géométrique de la production laitière du côté inoculé /à la moyenne géométrique de la production laitière des 2 côtés avant inoculation (essai 2)

3.3 – Comptages cellulaires

Dans les deux lignées, on note une variation cyclique des comptages cellulaires moyens pour chaque lignée :

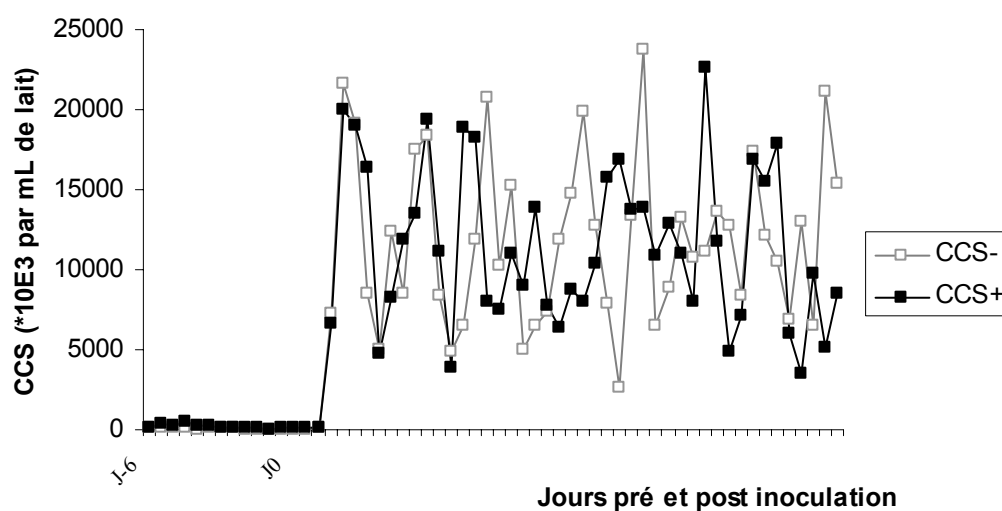


Figure 16 : Comptages des cellules somatiques du côté inoculé (essai 2)

Les comptages cellulaires augmentent brutalement à partir de J4 et suivent à partir de là des variations cycliques. Si on effectue un test de Student sur ces deux séries de données, on obtient une valeur de 0,842, donc la différence n'est pas significative entre les deux lignées.

3.4 – Bactériologie

La figure suivante, qui représente l'excrétion galactophore dans les deux lignées montre qu'on a une excrétion cyclique de bactéries pour les deux lignées. L'excrétion galactophore fluctue de manière plus importante pour la lignée CCS-, et atteint des valeurs significativement plus élevées.

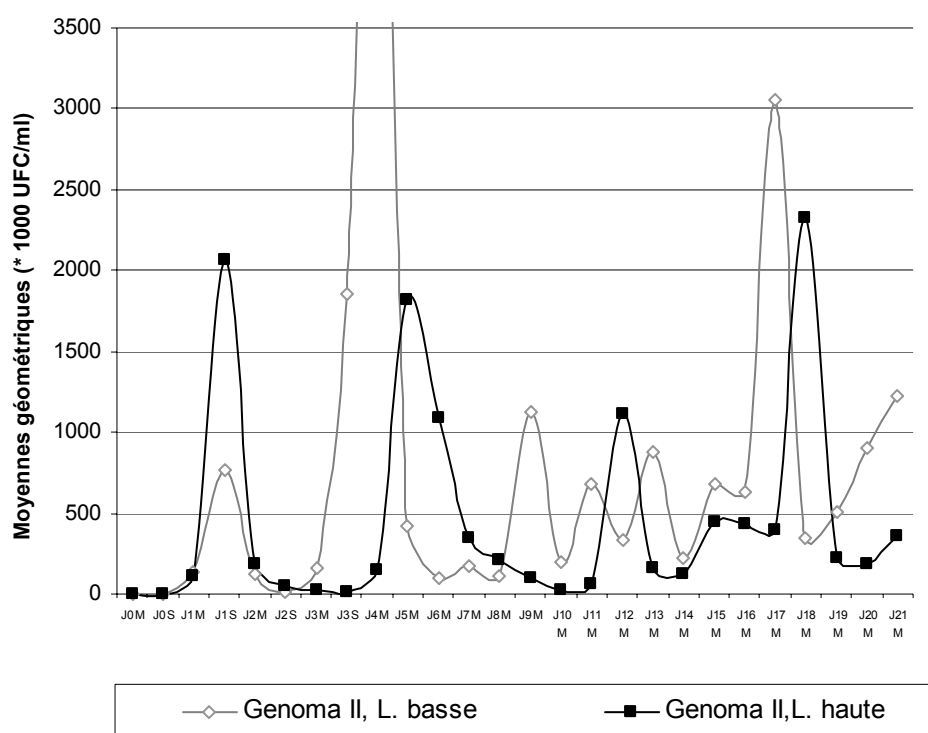


Figure 17 : Excrétion galactophore des deux lignées (essai 2)

4- Discussion

Les deux essais réalisés ne permettent pas de conclure de façon définitive par rapport à l'objectif global de cette étude, qui était de contribuer à vérifier que la diminution linéaire des CCS moyens s'accompagne bien d'un renforcement de la résistance des animaux aux mammites.

Lors de l'essai 1, les brebis CCS- ont exprimé une clinique aiguë et générale ayant conduit à la mort de trois d'entre elles et à la perte fonctionnelle d'hémi-mamelles. Les brebis CCS + ont au contraire développé une clinique locale et chronique. L'essai 2, lors duquel le titre inoculé était beaucoup plus faible, donne des réponses différentes selon les marqueurs étudiés. Il est nécessaire de discuter les matériels et méthodes employées et d'envisager les suites à donner à ces essais au vu des résultats obtenus.

4.1 - Discussion des matériels et des méthodes

4.1.1. Choix des brebis

4.1.1.1. Les ovins comme animal-modèle et animal-cible

L'espèce ovine a été choisie comme modèle pour étudier les mammites des ruminants pour différentes raisons. D'abord, il existe de fortes ressemblances entre la physiologie (mérocrine) et la physiopathologie de la mamelle et des mammites entre les ovins et les bovins. C'est beaucoup moins vrai pour les caprins, qui ont un mode de sécrétion apocrine du lait et une cellularité différente tant au plan quantitatif que qualitatif (Bergonier *et al.*, 2003). De plus, on dispose d'enregistrements CCS et d'une évaluation génétique sur une large population de brebis (Rupp *et al.*, 2003). Enfin, on a dans cette espèce une plus grande facilité pour élever, produire, et faire le suivi d'un nombre significatif d'animaux.

Les brebis ne sont pas seulement modèle dans l'étude, mais également cibles : cette sélection est aussi utilisée en élevage laitier ovin depuis 2002 (Rupp *et al.*, 2003).

4.1.1.2. Les lots : effet lignée et effet stade de lactation

Les lots choisis comprenaient cinq animaux chacun lors de l'essai 1 et quatre lors de l'essai 2. Les conditions matérielles et les exigences génétiques et sanitaires pour le choix des animaux ne permettaient pas d'utiliser des lots plus fournis. C'est clairement l'un des principaux facteurs limitants de cette expérimentation, car on a peu d'animaux (d'où un manque de puissance statistique) et des résultats potentiellement hétérogènes intra-lots.

Les mammites en conditions naturelles ont de plus été suivies au domaine de La Fage qui comptait 49 brebis de la lignée haute et 39 brebis de la lignée basse réf !!

Les brebis ont été choisies avec des mamelles saines. Elles avaient des bactériologies négatives avant leur départ de La Fage, pas de lésions mammaires ou d'anomalies morphologiques, des CCS les plus faibles possibles. Elles étaient de pères différents.

Les brebis sont toutes des primipares en début de lactation, elles avaient agnelés à la même période (janvier 2005). Dans l'essai préliminaire, les brebis étaient des multipares en fin de lactation. Les brebis en première lactation sont assez informatives puisque les mamelles peuvent être considérées comme non infectées avant le premier agnelage (Barillet *et al.*, 1999). Utiliser lors de nos essais des brebis toutes au même stade de lactation et au même rang d'agnelage permettait de supprimer les biais liés à ces deux facteurs. Le stade de lactation aurait pu, en théorie, jouer un rôle, puisqu'une phase d'immunosuppression *post partum* est décrite chez les ruminants. Elle était absente chez les brebis de l'essai préliminaire. Cependant, les brebis de la lignée haute n'ont pas présenté de tableau significativement plus grave que les animaux de ce précédent essai.

On a inoculé des brebis issues de lignées divergentes CCS, donc génétiquement différentes, entre elles, et différentes des brebis utilisées lors de l'essai préliminaire pour le choix de la souche et du titre à inoculer. Leur sélection a pu certainement entraîner une modification des défenses de la mamelle, défenses « basses » et/ou défenses « hautes ».

4.1.2. Choix de la souche

La souche bactérienne de *S. aureus* choisie pour les deux expérimentations était SA9A, apparue lors des essais préliminaires globalement moins pathogène que les autres (THI56C et B29D). On souhaitait l'établissement d'infections persistantes sans traduction clinique

(sur)aiguë : la souche choisie devait avoir une virulence modérée *in vivo* afin d'éviter la perte physique ou fonctionnelle de demi-mamelles par gangrène ou agalactie. Non seulement SA9A avait été initialement isolée d'un cas de mammite chronique ovine, sans signe aigu, mais elle présentait un équipement et une production toxiques (leucotoxines) intermédiaires entre les deux autres souches candidates. Surtout, elle avait été à l'origine de l'expression clinique la plus faible des trois souches en utilisant le même mode d'inoculation que lors de nos essais 2005, c'est-à-dire induction de mammites subaiguës, alors qu'au cours de la même expérimentation, des mammites gangréneuses ou de la mortalité avaient été enregistrées avec la souche THI56C.

Ainsi, l'association de l'historique de la souche, isolée par l'équipe de l'UMR INRA-ENVT 1225 dans un élevage ayant fait l'objet d'un suivi, de son génotypage et de la caractérisation de sa production leucotoxique (P. Rainard, INRA de Tours) et de son évaluation *in vivo* dans les mêmes conditions d'inoculation intra-citernale représentait le "maximum" de garanties que l'on pouvait se donner au départ.

4.1.3. Choix de l'inoculum

4.1.3.1. Préparation des inoculums

Les bactéries utilisées lors des essais 1 et 2 étaient en phase de plateau de croissance, phase caractérisée par des populations quantitativement élevées (avant dilutions pour ajuster aux titres voulus), et potentiellement productrices de toxines. Ce choix d'utiliser des bactéries en phase de plateau a été fait en particulier afin d'être plus précis dans le titre final souhaité (modifications plus rapides de titres en phase exponentielle avant les manipulations de dilutions décimales) et d'avoir une bonne reproductibilité de la préparation des inoculums d'une expérimentation à l'autre. La nature des toxines produites est probablement différente à ce stade de croissance par rapport à des temps plus précoces. Dans le but de se rapprocher le plus possible des conditions naturelles, il nous a paru important de ne pas inoculer de bactéries en phase exponentielle de croissance (métabolisme maximal), mais plutôt des cellules plus âgées. La méthode de préparation des inoculums n'a pas varié au cours des trois essais (essai préliminaire, essai 1, essai 2).

Les cultures ont été réalisées en eau peptonée, qui est un milieu moyennement riche. Il est possible de considérer ainsi que le métabolisme bactérien n'a pas été poussé au maximum

jusqu'à obtenir, là encore, des conditions de croissance trop artificielles. Cela aurait été sans doute le cas si on avait utilisé un milieu de culture plus riche (milieu cœur-cervelle ou gélose au sang) tels que parfois utilisés lors des infections expérimentales à *S. aureus* qui cherchent à caractériser l'action de *S. aureus* au niveau bactériologique, histologique et ultrastructurel (Gudding *et al.*, 1984, Hensen *et al.* 2000 : gélose au sang). On aurait pu à l'opposé choisir de travailler en milieu plus pauvre (eau et électrolytes par exemple, solution salée isotonique), comme cela parfois été fait dans la littérature (Nickerson *et al.*, 1981) mais cela aurait posé des difficultés techniques liées en particulier aux problèmes de la standardisation de croissance dans un tel milieu.

4.1.3.2. Titres inoculés

Suite aux essais préliminaires, on avait choisi d'inoculer la souche SA9A avec un titre de 1000 UFC car avec 10^2 , l'excrétion était incertaine : l'une des brebis n'avait pas excrété régulièrement, ce qui n'autorisait pas à quantifier l'excrétion. La souche choisie devait de plus pouvoir être inoculée avec un titre faible afin de rester proche des conditions naturelles présumées.

4.1.3.3. Modalité d'inoculation

Une inoculation intra-citernale a été choisie, méthode la plus couramment utilisée et référencée dans la bibliographie (Gudding *et al.*, 1984 : inoculation dans la partie papillaire du sinus lactifère ; Hensen *et al.* , 2000, Sears *et al.*, 1990 : inoculation dans la citerne du trayon).

L'avantage de cette méthode est qu'on connaît de manière précise le nombre d'UFC inoculées à la brebis et son titre n'est pas diminué par des mécanismes de défense passive de la mamelle.

L'inconvénient est lié justement aussi au fait qu'on passe outre ces défenses « basses » de la mamelle qui agissent habituellement dans les conditions d'infection naturelle. *Staphylococcus aureus* est une bactérie commensale de la peau ou des muqueuses saines ou lésées : son réservoir primaire dans un élevage est constitué principalement par les mamelles et les trayons infectés. Les défenses « basses » de la mamelle lors de contamination ascendante sont liées à l'anatomie du trayon : replis de la muqueuse, forme conique avec un diamètre distal inférieur au diamètre proximal limitant ainsi la contamination ascendante, sphincter qui se ferme une demi-heure à une heure après la traite, flux de lait limitant la

contamination par élimination mécanique des bactéries de la citerne, épithélium constitué d'une assise cellulaire kératinisée qui se desquame régulièrement et qui possède des propriétés bactériostatiques.

Pour éviter ce biais, l'inoculation aurait pu être réalisée par trempage standardisé de l'hémi-mamelle choisie dans un bouillon de culture bactérienne de titre constant. Cela présente l'avantage d'explorer de manière globale les défenses de la glande, en y intégrant les défenses « basses », et de se rapprocher des conditions naturelles par dépôt d'un saprophyte cutanéomuqueux sur la peau. L'inconvénient de cette méthode est que les titres infectants réels ne sont pas connus, et sans doute variables d'une brebis à l'autre pour un même bouillon de trempage standard. De plus, la durée de l'expérimentation est aléatoire : il est difficile de savoir quel est le nombre de trempages nécessaires pour infecter toutes les hémi-mamelles. Il est donc impossible par ce moyen d'avoir un jour d'inoculation J0 global pour toutes les brebis. Enfin, le maintien au laboratoire d'un bouillon de culture de titre et de nature métabolique constants au cours du temps n'est pas chose aisée.

Il serait également possible de réaliser une inoculation dans le canal du trayon (ou dans la partie distale du sinus du trayon), pour mieux maîtriser le départ de l'expérimentation (identique pour toutes les brebis) et le titre infectant. Il est cependant délicat sur un trayon de brebis d'avoir la précision millimétrique nécessaire pour ce type de méthode, exceptionnellement utilisée selon la littérature.

Il paraissait donc légitime de commencer par cette technique d'inoculation, simple, hautement standardisable et très largement utilisée, quitte à en changer pour les essais à venir (cf infra).

4.1.4. Méthodologie de suivi des animaux

Les brebis ont été conduites de manière classique et de la même façon pour les deux lots et pour les deux essais : traite biquotidienne, changement d'alimentation progressif, alimentation à base de fourrages et de concentrés, sur litière. Les deux lots étaient mélangés (pas d'ordre de traite) et donc soumis à la même pression d'infection éventuellement présente dans les locaux de l'ENVT.

Les palpations, l'observation des déséquilibres mammaires et des lésions ont été faites par un groupe réduit de même personnes tout au long de chaque essai et d'un essai sur l'autre.

Les notes cliniques calculées prenaient seulement en compte des critères locaux (abcès, rougeur, déséquilibre, induration, adénite rétro-mammaire) ; la clinique aiguë n'a pas été codifiée mais seulement décrite.

Pour réduire l'effet trayeur sur la production laitière mesurée, une personne unique achevait la traite de toutes les demi-mamelles.

4.1.5. Comptages cellulaires et suivi bactériologique

Les comptages cellulaires ont été réalisés par la méthode conventionnelle : la technique opto-fluoro-électronique au CIAL SO. Tous les prélèvements ont été dupliqués et réalisés sur la première fraction et le lait de traite. Un ensemble de quatre points décrivait donc une héli-mamelle lors d'une traite.

Il a été tenu compte de l'absence de co-infection qui aurait pu modifier les résultats observés par ensemencements réguliers de prélèvements sur gélose au sang de mouton. Le dénombrement bactérien a été réalisé selon les méthodes bactériologiques conventionnelles (dilutions décimales) car nous souhaitons obtenir des résultats relatifs aux cellules bactériennes revivifiables. Un complément par PCR quantitative en temps réel pourra être apporté. Un cycle de congélation-décongélation préalable aux ensemencements a été systématiquement réalisé afin de faire éclater les phagocytes pouvant avoir ingéré des staphylocoques. Enfin, une série de cinq répliques par dilution pour chaque point a été réalisée afin d'avoir une précision optimale.

4.2 - Discussion des résultats

4.2.1. Résultats de l'essai 1

Lors de l'essai 1, l'expression clinique a été très différente entre les lots CCS+ et CCS-.

4.2.1.1. Clinique

Les brebis de la lignée basse (CCS-) ont présenté des mammites aiguës à suraiguës, incluant des pertes physiques ou fonctionnelles d'héli-mamelles (œdème, gangrène,

agalactie). Les brebis de la lignée haute (CCS+), supposées plus sensibles aux mammites, ont quant à elles présenté une clinique plutôt chronique, et localisée : abcès sur la mamelle, induration, abattement transitoire, nœuds lymphatiques des côtés inoculés augmentés de volume, hyperthermie statistiquement moins élevée que celle des brebis de l'autre lot. Les brebis de la lignée CCS- n'ont pas développé de réactions locales telles que des abcès sur la mamelle : l'évolution clinique a été trop rapide pour que des abcès puissent s'installer. Les notes cliniques des brebis CCS+ ont cependant été plus élevées que celles des brebis CCS-, justement parce qu'elles prenaient en compte ces critères locaux. Dans le lot CCS-, les côtés non inoculés ont eu des notes cliniques moyennes globalement supérieures à celles des côtés inoculés (figure 4). Ceci vient du fait que, dans la plupart des cas, le côté déséquilibré (le plus petit) était le côté non inoculé chez ces brebis, qui de toute façon ne produisaient plus de lait par aucun des deux côtés. En effet, suite à l'inoculation, le côté inoculé présentait une hypertrophie liée à la réaction locale : inflammation associée à un changement de couleur (rosissement), et souvent de l'œdème, précédant parfois une gangrène expansive.

Les brebis supposées sensibles ont beaucoup mieux résisté que les supposées résistantes : la clinique est restée localisée à la mamelle (abcès, rougeur, induration), et, après une chute, la production laitière est remontée jusqu'à des niveaux presque identiques à ceux précédant l'inoculation.

De plus, la perte de trois brebis d'un lot et l'agalactie chez les autres (agalactie que l'on ne pouvait pas prévoir au vu de l'essai préliminaire), ont été à l'origine de l'absence importante de données enregistrables pour cette première expérience : à partir de J2, on n'a plus de production laitière pour les brebis CCS-, les rares échantillons prélevés sont trop modifiés pour être traités, en cytométrie de flux et marquage en technique opto-fluoro-électronique. Plus généralement, l'agalactie est telle qu'un effet concentration très important gêne l'interprétation des différents dénombrements (cellulaires ou bactériologiques).

4.2.1.2. Influence de la lignée

La souche utilisée au titre de 1000 UFC lors de l'essai préliminaire était globalement moins pathogène que les autres. Elle avait cependant été testée sur des brebis non sélectionnées sur le critère CCS alors que, lors des essais 1 et 2, on a inoculé des brebis issues

de lignées divergentes CCS, donc génétiquement différentes. Leur sélection a pu entraîner une modification des défenses de la mamelle.

Les facteurs rang et stade de lactation, différents entre l'essai préliminaire et nos essais, auraient été considérés comme des facteurs ayant pu être à l'origine des différences obtenues si la gravité accrue enregistrée lors de l'essai 1 l'avait été pour les deux lots de brebis. Celle-ci n'ayant été observée que pour l'un d'entre eux, notre hypothèse est plutôt que la différence observée est liée à un effet lignée.

Ces résultats ont mené au lancement immédiat d'une deuxième expérimentation dès que la première fut finie, en utilisant cette fois-ci un titre d'inoculum beaucoup plus bas : 15 UFC.

4.2.2. Résultats de l'essai 2

4.2.2.1. Expression clinique et fonctionnelle

Après l'inoculation, une seule brebis, appartenant au lot CCS+, a présenté des signes cliniques aigus. Elle a commencé à présenter des signes cliniques marqués quatre jours après l'inoculation, qui ont conduit à sa mort sept jours après l'inoculation, approximativement à la date de la deuxième brebis morte lors de l'essai 1.

Les autres brebis ont présenté des mammites de type subaigu (modifications de la sécrétion principalement) pour les CCS- et subclinique pour les CCS+. Après quelques jours de léger abattement et d'anorexie pour certaines d'entre elles, elles ont, quelle que soit leur lignée, présenté un état général normal, et ont recommencé à s'alimenter correctement.

La différence entre les températures moyennes des deux lots n'était pas significative. Dans les deux cas, on a eu deux pics de températures : le soir suivant l'inoculation, puis quelques jours après, avec un deuxième pic décalé de deux traites pour les brebis CCS-. On observe un nadir entre les deux pics : de J2 à J3 pour les CCS+ et de J2 à J5 pour les CCS-, les températures moyennes redescendent en dessous du seuil de 39,5°C. Ce deuxième pic légèrement décalé pourrait être mis en relation avec les dénombrements bactériologiques et les comptages cellulaires. Il est possible que le deuxième pic corresponde à un pic d'excrétion bactérienne quelques jours après inoculation. Les moyennes indiquent que les brebis redeviennent normothermiques à partir de J8 et le restent. On retrouve des résultats rappelant ceux de l'essai préliminaire (Bergonier, communication personnelle). Dans ces essais, pour

les brebis inoculées avec la souche SA9A (la moins virulente), on observe une hyperthermie ondulante, avec trois pics de températures espacés de quatre puis sept jours. Pour les brebis inoculées avec la souche THI56C, les courbes étaient caractérisées par la présence d'un pic, puis d'un nadir, puis d'un deuxième pic. Cela pourrait s'interpréter comme une forme d'exacerbation en fin de première semaine après l'inoculation.

Concernant l'expression clinique et fonctionnelle de ces brebis suite à l'inoculation, il est difficile de conclure en faveur d'une réponse plus efficace contre l'infection pour une lignée ou pour l'autre selon les marqueurs étudiés. On a observé une clinique mammaire plus favorable pour les brebis CCS+, en particulier du point de vue des modifications fonctionnelles (aspect de la sécrétion), nonobstant bien sûr la mort d'une brebis de la lignée haute.

Selon qu'on inclut ou non cette brebis morte (4039) du groupe CCS+, on obtient des résultats opposés quant à la comparaison des productions moyennes de lait. Après la mort de la brebis 4039, la production laitière moyenne des trois brebis CCS+ restantes n'est pas significativement différente de celle des quatre brebis CCS-, que ce soit du côté inoculé ou du côté non inoculé. De plus, la récupération fonctionnelle des deux héli-mamelles (inoculées et non inoculées) des brebis de la lignée haute est plus rapide, toujours si l'on exclut la brebis morte.

4.2.2.2. Comptages cellulaires

L'existence dans cet essai de données interprétables permet d'observer la nature cyclique de l'activation cellulaire (aussi bien dans le lot CCS+ que le CCS-), telle qu'elle est décrite dans la littérature (Daley et al., 1991 a et b). Ces comptages cellulaires cycliques ne sont pas significativement différents entre les deux lignées. Il est cependant possible de noter deux éléments :

1- du côté non inoculé, les moyennes géométriques des héli-mamelles de la lignée basse sont plus élevées (différence non significative),

2- du côté inoculé, les moyennes géométriques des héli-mamelles de la lignée haute semblent montrer un recrutement cellulaire plus précoce et plus intense : les moyennes

géométriques sont multipliées par trois à la traite du soir à J1 et J2. Sur la foi de ces moyennes, portant certes sur un petit nombre d'animaux, le premier pic cellulaire semblerait ainsi décalé d'une traite (intervalle nocturne d'approximativement 13 à 14 heures) entre les deux lignées. Il faut toutefois garder à l'esprit que cette différence de moyennes est en fait liée à une seule brebis. Nous soulignons cependant ce point car ce décalage apparent dans le recrutement cellulaire local a été noté lors des deux essais. De plus, il a également été mis en évidence en 2006 lors des inoculations de *S. epidermidis* (Bergonier, communication personnelle). Sa confirmation se heurte ici au problème des effectifs trop réduits. Ce point devra être précisé et quantifié à l'avenir en réalisant des cinétiques beaucoup plus rapprochées (prélèvements toutes les 2 heures par exemple). La précocité du recrutement neutrophilique est en effet un point déterminant pour les défenses de la mamelle vis-à-vis d'une bactérie hautement toxigène comme *S. aureus*.

Plus généralement (pour les deux essais), cette question des cinétiques respectives de multiplication bactérienne (et de toxinogénèse) et de diapédèse est à l'origine de l'une des hypothèses explicatives des différences obtenues au cours du présent travail entre les lignées. Les signes cliniques obtenus (lignée basse de l'essai 1) sont au moins en partie des signes d'intoxication. La toxinogénèse dépend, entre autres, du titre bactérien, des conditions du milieu et donc ici de la phase de latence existant entre le dépôt des bactéries dans la citerne et la remultiplication ou la réactivation métabolique des bactéries. Cette latence est d'abord liée dans notre cas à la vidange réalisée à la traite qui a suivi pour toutes les brebis (rapidité de l'adhésion ?), et à la fois à la précocité et à l'intensité du recrutement neutrophilique. Il est possible que les brebis de la lignée basse aient présenté un recrutement légèrement plus tardif, ce qui aurait pu permettre une multiplication et/ou une toxinogénèse plus importante dès le départ. Dans le cas particulier d'un inoculum relativement abondant (essai 1) d'une bactérie possédant une forte machinerie métabolique au plan toxique (en particulier leucotoxique), un léger retard peut être fatal. L'efficacité des défenses de la lignée basse, montrée à La Fage, peut être liée, en amont, au rôle de sentinelle des cellules macrophagiques et/ou épithéliales (y compris éventuellement distales : canal). Ces éléments nous renvoient vers la nécessité d'explorer les défenses de la mamelle dans leur totalité.

4.2.2.3. Excrétion bactérienne galactophore

L'excrétion galactophore a pu être suivie jusqu'à la fin de l'expérimentation. Elle a été cyclique dans les deux cas (figure 19), tel que cela a été décrit dans la littérature (Sears *et al.*, 1990). L'excrétion galactophore fluctue de manière plus importante pour la lignée CCS-, et atteint des valeurs significativement plus élevées.

On a eu deux pics d'excrétion beaucoup plus marqués à J3 et J18 pour les brebis CCS-. Le premier pic d'excrétion bactérienne le soir de J1 a lieu au même moment que le premier pic de température. Le deuxième pic d'excrétion est plus précoce pour les brebis CCS- qui ont pourtant eu un deuxième pic de température plus tardif.

En résumé, pour la comparaison des deux lignées du point de vue de la résistance à l'infection intra-mammaire lors de l'essai 2, les éléments suivants sont en faveur d'une atteinte plus marquée :

- de la lignée haute : une brebis morte (contre aucune pour la lignée basse) (et, accessoirement, la note clinique des côtés non inoculés). Par ailleurs, des dosages de sérumalbumine et de caséines β ont été réalisés dans le lactosérum des brebis après inoculation. Les premiers résultats semblent montrer une inflammation plus nette des mamelles des brebis CCS+ (P. Martin, communication personnelle).

- de la lignée basse : modification plus fréquente et/ou plus marquée de la sécrétion lactée, concentration bactérienne excrétée supérieure et, si l'on n'inclut pas la brebis morte, quantités de lait produites inférieures.

Par ailleurs, des différences dans la cinétique des différents événements physiopathologiques ont été enregistrées. En particulier, le deuxième pic hyperthermique, l'atteinte et la récupération fonctionnelle mammaires (lait) – et peut-être le recrutement cellulaire initial – sont plus précoces pour la lignée haute.

Ainsi, les caractéristiques physiopathologiques obtenues ne permettent pas de conclure : elles sont divergentes et trop dépendantes des effectifs, réduits en particulier pour l'essai 2.

4.2.3. Bilan des deux essais, discutés en comparaison avec l'essai préliminaire et les résultats observés en conditions naturelles à La Fage

4.2.3.1. Comparaison avec l'essai préliminaire

Lors de l'essai 1, l'inoculum avait un volume de 0,5 mL et contenait approximativement 10^3 UFC. Suite à l'inoculation, on a observé des signes de clinique générale aiguë à suraiguë chez les brebis de la lignée basse (CCS-). Trois brebis sur les 5 sont mortes brutalement, respectivement trois, huit et douze jours après l'inoculation. Elles ont présenté rapidement une forte baisse d'état général et des signes d'intoxication et/ou de bactériémie (arthrites, diarrhée, affaiblissement général, problèmes respiratoires). Les autres ont présenté de l'agalactie. Une brebis sur les cinq a eu une gangrène très expansive sur la demi-mamelle inoculée. Les résultats observés ont donc été en désaccord avec ceux que l'on attendait. Pour un titre d'inoculum correspondant à celui utilisé dans l'essai préliminaire, on a observé une clinique assez spectaculaire, qui a provoqué chez les brebis supposées résistantes des pertes physiques ou fonctionnelles de demi-mamelles (gangrène chez l'une d'elle et agalactie).

Les bactéries utilisées lors des trois essais étaient en phase de plateau de croissance, phase caractérisée par des populations quantitativement élevées (avant dilutions pour ajuster aux titres voulus), et potentiellement productrices de toxines. La toxinogénèse est probablement soutenue en phase de plateau de croissance, en particulier pour certaines toxines. Cet élément aurait pu être à l'origine de la gravité constatée, mais, encore une fois, celle-ci n'est observée qu'au sein d'une des deux lignées lors d'une expérimentation (essai 1), alors que la méthode de préparation des inoculums n'a pas varié au cours des trois essais (essai préliminaire, essai 1, essai 2).

Les signes cliniques ou fonctionnels obtenus sur la lignée haute lors de l'essai 1 ont été du même ordre que ceux de l'essai préliminaire avec la même souche – et que ceux de l'essai 2, hormis la brebis morte. La particularité est donc bien constituée par la lignée basse inoculée à 10^3 UFC.

Les toxines produites in vitro par les bactéries jusqu'en phase de plateau ont-elle pu provoquer les signes graves observés, indépendamment d'une production toxinique post-inoculation ? Deux arguments au moins plaident en défaveur de cette hypothèse : le premier

est qu'une dilution d'un facteur 10^5 pour l'essai 1 et d'un facteur 10^7 pour l'essai 2 ont été réalisées avant inoculation pour ajuster aux titres respectifs de 10^3 et 15 UFC ; le deuxième est que les mortalités ont été très échelonnées : de J3 à J12 post inoculation.

4.2.3.2. Comparaison avec les résultats observés en conditions naturelles

Au domaine de La Fage d'où étaient issues nos brebis, le reste des brebis des lignées divergentes a été suivi durant toute la campagne aux plans clinique (aigu et chronique), cellulaire (CCS) et bactériologique. Les brebis étaient soumises à la pression d'infection de cet élevage représentatif du bassin laitier. Il a été montré que les brebis de la lignée haute avaient présenté plus de mammites cliniques (aiguës et chroniques), plus d'infections intramammaires subcliniques et des comptages cellulaires moyens plus élevés (différences significatives) que les brebis de la lignée basse (Rupp *et al.*, 2006).

4.3 – Suites à donner aux essais

Les suites à donner aux essais 1 et 2 viseront à retrouver les résultats observés à La Fage, selon plusieurs schémas possibles.

4.3.1. **Modalités méthodologiques envisagées pour les essais suivants**

4.3.1.1. Changement de modalité d'infection expérimentale en conservant la même souche

S. aureus est un germe commensal de la peau des mamelles et trayons. On peut envisager d'infecter les mamelles des brebis par trempage standardisé de la demi-mamelle choisie dans un bouillon de culture bactérienne de titre constant. On explore ainsi de manière globale les défenses de la glande, en y intégrant les défenses « basses », et on se rapproche des conditions naturelles par dépôt d'un saprophyte cutanéomuqueux sur la peau. Les avantages et inconvénients de cette méthode ont été discutés au 4.1.3.2..

4.3.1.2. Changement d'espèce staphylococcique pour utiliser *Staphylococcus epidermidis*

Il s'agit de l'espèce la plus fréquente des staphylocoques à coagulase négative (SCN), groupe représentant approximativement 80% des agents étiologiques des mammites subcliniques à subaiguës (Bergonier *et al.*, 2003 a), d'où une cohérence plus grande avec les fondements même du schéma étudié et avec les principes de procréation des brebis utilisées. C'est de plus l'espèce la plus pathogène au sein des SCN, sans posséder toutefois l'équipement toxinique de *S. aureus* : nous évitons ainsi les risques de mortalité ou de mammites gangréneuses, sans changer pour autant de genre bactérien.

Cette solution a été choisie en 2006 (Bergonier, communication personnelle), et a confirmé une meilleure résistance à l'inoculation intra-citernale de la lignée basse. Ces résultats, associés au suivi des mammites spontanées (majoritairement dues à des SCN) au domaine INRA de La Fage, vont bien dans le sens attendu : les brebis de la lignée basse résistent mieux aux infections intra-mammaires que celles de la lignée haute, tant aux plans clinique et bactériologique que cellulaire. Cette conclusion serait en faveur de la remise en cause des modalités d'inoculation utilisées, dans le présent travail et dans la littérature, pour un pathogène majeur comme *S. aureus* tout particulièrement. L'inoculation intra-citernale de bactéries actives métaboliquement et de pouvoir pathogène certain, même si la souche de *S. aureus* était hypovirulente, est probablement trop drastique pour mimer la réalité. Elle n'interroge donc probablement pas la totalité des mécanismes de défense de la glande mammaire et illustre un cas particulier ne représentant pas le potentiel immunitaire de la lignée basse.

4.3.1.3. Changement de l'état métabolique de la souche et utilisation dans un état plus végétatif

Cela permettrait de limiter la production toxinique précoce en augmentant la latence, et cela présenterait l'avantage de se rapprocher des conditions naturelles. L'inconvénient est que si l'on utilise des cultures âgées, on risque d'inoculer aussi de cette manière des corps bactériens morts (membranes) avec un pouvoir immunogène potentiel. Si l'on utilise des milieux de culture très pauvres, il est difficile d'avoir des courbes de croissance standardisables et suffisantes pour obtenir les différents titres souhaités. Ces approches posent donc des problèmes techniques.

4.4.1.4. Schémas expérimentaux envisagés

Différents schémas expérimentaux ont donc été envisagés pour les expérimentations suivantes, en effectuant seuls ou associés les changements décrits dans les paragraphes précédents.

* schéma 1 :

- une expérimentation n°3 qui utiliserait *Staphylococcus epidermidis* dans les mêmes conditions que précédemment, c'est-à-dire en l'inoculant par voie intra-citernale avec un titre de 10^3 ;

- puis une expérimentation n°4 de confirmation ou de précision en cas d'inversion de la réponse, ou intégrant d'autres modifications dans le cas contraire.

* schéma 2 :

- une expérimentation n°3 qui associerait les trois modifications prédéfinies, et qui consisterait donc en un trempage dans un bouillon de *Staphylococcus epidermidis* cultivé en milieu pauvre ;

- une expérimentation n°4 qui consisterait en un « découpage » de l'expérimentation 3, en vue d'identifier la (ou les) modification(s) déterminante(s).

* schéma 3 :

- une expérimentation n°3 qui serait une inoculation intra-citernale de SA9A cultivée en milieu pauvre au titre de 15 UFC (comme dans l'essai 2) ;

- une expérimentation n°4 qui permettrait, comme dans le schéma 2, de confirmer, préciser, ou réorienter les résultats.

4.3.2. **Hypothèses face aux résultats des essais 2005**

La lignée basse est plus résistante vis-à-vis des infections spontanées à La Fage et vis-à-vis des infections expérimentales par inoculation intra-citernale par *S. epidermidis* (Bergonier, communication personnelle). La question se pose de savoir ce qui a pu se passer pour que nous obtenions lors des essais 2005 des réponses différentes, voire opposées lors de l'essai 1.

La différence ne vient pas de la souche utilisée, qui est hypovirulente, ni du titre, bas lors de l'essai 2. On peut remettre en question le site de dépôt de l'inoculum de *S. aureus* SA9A, mais cette méthode d'inoculation intra-citernale est communément utilisée dans la bibliographie pour ce germe. On peut s'interroger sur le statut des bactéries, cultivées dans de l'eau peptonée, mais c'est un milieu moyennement riche, et, comme nous l'avons dit plus haut, elles ont été cultivées de la même façon lors des deux essais.

Il y a un intervalle d'une traite en moyenne entre certains pics réactionnels (CCS, dénombrement bactérien, température) entre les brebis CCS+ et CCS-, tout en ayant une forte hétérogénéité intra-lot.

On peut formuler deux hypothèses :

- hypothèse 1 : les brebis ont été éprouvées dans des conditions trop drastiques et/ou n'explorant pas l'ensemble des défenses de la glande (hypothèse la plus probable) ;
- hypothèse 2 : on a utilisé des brebis sélectionnées principalement pour la résistance contre les pathogènes mineurs (SCN surtout) et moins contre les pathogènes majeurs au premier rang desquels chez les ovins laitiers se trouve *S. aureus*. En effet, lors de la création des lignées, les brebis ont été sélectionnées à partir de valeurs de comptages cellulaires en conditions naturelles qui sont le reflet de mammites subcliniques ou chroniques principalement dues à des pathogènes mineurs. Certains effecteurs ou certaines voies de la réponse immunitaire seraient alors potentiellement différents entre les SCN et des bactéries comme *S. aureus* fortement toxigènes et à multiplication plus rapide.

- Conclusion -

Ce travail et les inoculations qui y sont présentées faisaient partie d'un programme plus large destiné à analyser les mécanismes immunitaires de la mamelle de la brebis lors d'infection mammaire bactérienne ou staphylococcique et visait à comparer les tableaux cliniques, fonctionnels, bactériologiques et cellulaires de lignées ovines divergentes pour les comptages cellulaires.

Au sein de ce programme, la présente thèse s'intéressait à la première année d'expérimentations portant sur l'inoculation intra-mammaire de *Staphylococcus aureus* sur des brebis primipares issues de deux lignées divergentes pour le comptage cellulaire, et ce en début de lactation et à deux titres bactériens différents. Lors de la première expérimentation, les brebis de la lignée basse ont développé une clinique aiguë et générale, qui a conduit à la mort brutale de trois d'entre elles, et à la perte fonctionnelle de demi-mamelles, présentant des mammites nécrotico-gangréneuses pour les deux autres. De ce fait, peu de données analytiques ont pu être acquises après quelques jours dans ce lot. Chez les brebis de la lignée haute, l'inoculation a eu seulement pour conséquence une clinique locale et chronique du type de celle obtenue dans l'essai préliminaire de sélection de la souche. La production laitière a été significativement différente pour les deux lots : les brebis CCS- ont produit beaucoup moins, elles ont de plus excrété significativement plus de bactéries dans leur lait. Cependant, du fait de la disparition précoce d'une grande partie de l'effectif, les résultats quantitatifs, en particulier de comptages cellulaires, ont été difficilement interprétables.

Lors du deuxième essai, où le titre inoculé était beaucoup plus faible, des résultats contradictoires ont été obtenus. La mort d'une brebis de la lignée haute après quelques jours de clinique aiguë gêne l'interprétation des résultats (conclusions différentes selon que l'on inclut ou pas cette brebis). Les différents critères physiopathologiques de caractérisation des infections induites divergent, si bien que l'on ne peut répondre définitivement, au terme de cette première série d'études, à la question posée.

Si les deux essais présentés ici n'ont pas produits de résultats univoques ni concordants, ils sont par ailleurs en contradiction avec le suivi des mammites spontanées au domaine INRA de La Fage, qui montrent bien, de diverses manières, une meilleure résistance de la lignée basse en conditions naturelles. De plus, cette résistance accrue de la lignée basse a été

ultérieurement démontrée à l'ENVT après inoculation intra-citernale de *Staphylococcus epidermidis*.

Ces discordances nous amènent à soulever la question de la validité de la méthode d'épreuve intra-mammaire, même si elle est uniformément utilisée dans la littérature et, actuellement, par les autres équipes travaillant sur ce type de sujet. Les pistes à explorer pour une deuxième étape peuvent être relatives, d'une part, au choix d'espèces bactériennes autres que *S. aureus* (plus fréquemment à l'origine d'infections intra-mammaires subaiguës à subcliniques) et, d'autre part, à l'utilisation d'autres méthodes d'inoculation, moins drastiques.

La confrontation des résultats des différentes séries d'inoculation intra-mammaire (2004 à 2007) et du suivi des mammites spontanées durant plusieurs campagnes au domaine INRA de La Fage permettra de montrer la meilleure résistance aux mammites des brebis de la lignée basse.

- Sources bibliographiques -

ALBENZIO, M., TAIBI, L., CAROPRESE, M. *et al.*

Immune response, udder health and productive traits of machine milked and suckling ewes.

Small Rumin Res, 2003, **48** : 189-200.

BALABAN, N., RASOOLY, A.

Staphylococcal enterotoxins.

Int J Food Microbiol, 2000, **61** (1) : 1-10.

BARILLET, F., MARIE, C., JACQUIN, M. *et al.*

The French Lacaune dairy sheep breed: use in France and abroad in the last 40 years.

Livestock Production Science, 2001, **71** : 17-29.

BARILLET, F., RUPP, R., MIGNON-GASTREAU, S. *et al.*

Genetic analysis for mastitis resistance and somatic cell score in French Lacaune dairy sheep.

Milking and milk production of dairy sheep and goats. *In* : Proceedings of the 6th International Selection on the Milking of Small Ruminants, Athens, Greece Wageningen Pers, The Netherlands, 1999, pp 393-399.

BARRIO, M.B., RAINARD, P., PREVOST, G.

LukM/LukF⁺-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils.

Microbes Infect, 2006, **8** (8) : 2068-2074.

BASELGA, R., ALBIZU, I., AMORENA, B.

Staphylococcus aureus capsule and slime as virulence factors in ruminant models. A review.

Vet Microbiol, 1994, **39** (3-4) : 195-204.

BERGONIER, D.

Les mammites de la brebis laitière : étiologie et épidémiologie.

In : Actualités sur la maîtrise des infections mammaires des brebis laitières, Intervet Edit. 2005.

BERGONIER, D., de CREMOUX, R., RUPP, R. *et al.* (Bergonier *et al.*, 2003 a)

Mastitis of dairy small ruminants.

Vet Res, 2003, **34** : 689-716.

BERGONIER, D. BERTHELOT, X. (Bergonier *et al.*, 2003 b)

New advances in Epizootiology and control of ewe mastitis.

Livest Prod Sci, 2003, **79** : 1-16.

BERGONIER, D., LAGRIFFOUL, G., BERTHELOT, X.

Le tarissement des brebis laitières : conduite et antibiothérapie.

Journées nationales SNGTV – INRA, Clermont-Ferrand, 30 mai-1^{er} juin 2001, pp 295-299.

BHAKDI, S., TRANUM-JENSEN, J.

Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*.

Microbiol Rev, 1991, **55** : 733-751.

BOHACH, G.A., JABLONSKI, L.M., DEOBALD, C.F. et al.

Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses.

Crit Rev Microbiol, 1990, **17**: 251-272.

CHAVAKIS, T., WIECHMANN, K., PREISSNER, K.T., HERRMANN, M.

Staphylococcus aureus interactions with the endothelium: the role of bacterial « secretable expanded repertoire adhesive molecules » (SERAM) in disturbing host defense systems.

Thromb Haemost, 2005, **94** (2) : 278-285.

COLLEN, D., LIJNEN, H.R., VANDERSCHUEREN, S.

Staphylokinase : fibrinolytic properties and current experience in patients with occlusive arterial thrombosis.

Verh K Acad Geneseend Belg, 1995, **57** (3) : 183-98.

DALEY, M., COYLE, P., WILLIAMS, T. et al. (Daley et al., 1991 a)

Staphylococcus aureus mastitis: pathogenesis and treatment with bovine Interleukin-1 β and Interleukin-2.

J Dairy Sci, 1991, **74** : 4413-4424.

DALEY, M., OLDHAM, E., WILLIAMS, T. et al. (Daley et al., 1991 b)

Quantitative and qualitative properties of host polymorphonuclear cells during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis in cows.

Am J Vet Res., 1991, **52** (3) : 474-479.

DHOPLE, V.M., NAGARAJ, R.

Conformation and activity of delta-lysin and its analogs.

Peptides, 2005, **26** (2) : 217-225.

DINGES, M., ORWIN, P., SCHLIEVERT, P.

Exotoxins of *Staphylococcus aureus*.

Clin Microbiol Rev, 2000, **13** : 16-34.

DOERY, H.M., MAGNUSON, B.J., CHEYNE, I.M. et al.

A phospholipase in staphylococcal toxin which hydrolyzes sphingomyelin.

Nature (London), 1963, **198**: 1091-1093.

FOSTER, T.J., McDEVITT, D.

Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus* : their possible roles in virulence.

FEMS Microbiol Letter, 1994, **118** (3) : 199-205.

FREER, J.H., BIRBECK, T.H.

Possible conformation of delta-lysin, a membrane damaging peptide of *Staphylococcus aureus*.

J Theor Biol, 1982, **94**: 535-540.

FRUGANTI, G., RANUCCI, S., TESEI, B. *et al.*

Valutazione dello stato sanitario della mamella di pecore durante un intero ciclo di lattazione.

Clinica Vet, 1985, **108** : 286-296.

GOUAUX, E.

Alpha-hemolysin from *Staphylococcus aureus* : an archetype of beta-barrel, channel-forming protein.

J Struct Biol, 1998, **121** (2) : 110-122.

GLENNY, A.T., STEVENS, N.F.

Staphylococcal toxins and antitoxins.

J Pathol Bacteriol, 1935, **52** : 134-137.

GONZALO, C., GAUDIOSO LACASA, V.R.

Evolution des types cellulaires du lait de brebis (race Churra) en fonction des dénombrements cellulaires totaux pendant la traite mécanique et manuelle.

Ann Zoot, 1985, **34** : 257-264.

GOTAZ, F., VERHEIJ, H.M. ; ROSENSTEIN, R.

Staphylococcal lipases: molecular characterisation, secretion, and processing.

Chem Phys Lipids, 1998, **93** : 15-25.

GUDDING, R., McDONALD, J.S., CHEVILLE, N.F.

Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* mastitis: bacteriologic, histologic, and ultrastructural findings.

Am J Vet Res, 1984, **45** (12) : 2525-2531.

HAMAD, A.R., MARRACK, P., KAPPLER, J.W.

Transcytosis of staphylococcal superantigens toxins.

J Exp Med, 1997, **185**: 1447-1454.

HENSEN, S.M., PAVICIC, M.J.A.M.P, LOHUIS, J.A.C.M *et al.*

Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ.

J Dairy Sci, 2000, **83** : 1966-1975.

JONAS, D., WALEV, I., BERGER, T., *et al.*

Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxins in T-lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradations.

Infect Immun, 1994, **62** : 1304-1312.

JORGENSEN, H.J., MORK, T., RORVIK, L.M.

The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese.

J Dairy Sci, 2005, **88** (11) : 3810-3817.

KENT, T.H.

Staphylococcal enterotoxin gastroenteritis in Rhesus monkeys.

Am J Pathol, 1966, **48** : 387-407.

KONIG, B., PREVOST, G., KONIG, W.

Composition of staphylococcal bi-component toxins determines pathophysiological reactions.

J Med Microbiol, 1997, **46** : 479-485.

LAGRIFFOUL, G., BERGONIER, D., BERNARD, J. et al. (Lagriffoul *et al.*, 1996 a)

Les numérations de cellules somatiques du lait de brebis en France : situation actuelle et perspectives.

In : Rubino, R. (Ed), Proceedings of Somatic cells and milk of Small Ruminants, International Symposium, Bella, Italy

Wageningen Pers, The Netherlands, 1996, pp 343-347.

LAGRIFFOUL, G., BERGONIER, D., BERTHELOT, X. et al. (Lagriffoul *et al.*, 1996 b)

Facteurs de variation génétiques et non génétiques des comptages de cellules somatiques du lait de brebis en relation avec les caractères laitiers et les mesures portant sur le lait de tank.

In : Rubino, R. (Ed), Proceedings of Somatic cells and milk of Small Ruminants, International Symposium, Bella, Italy

Wageningen Pers, The Netherlands, 1996, pp 149-155.

LAGRIFFOUL, G., BARILLET, F., BERGONIER, D. et al.

Relation entre les comptages de cellules somatiques du lait de troupeau et la prévalence des mammites subcliniques des brebis estimée avec les comptages de cellules somatiques individuels.

In : Barillet, F., Zervas, N.P. (Eds), Proceedings of the 6th International Selection on the Milking of Small Ruminants. Milking and milk production of dairy sheep and goats, Athens, Greece

Wageningen Pers, The Netherlands, 1999, pp 151-156.

LAMMERS, A., NUIJTEN, P., KRUIJT, E. et al.

Cell tropism of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary gland cell structures.

Vet Microbiol, 1999, **67** (2) : 77-89.

LE BIHAN, E.

Intérêt et modalités possibles de la prise en compte des mammites dans la sélection des bovins laitiers.

DEA de Statistiques et Santé, Paris XI-INRA, 1992 : 34pp et annexes.

LEE, K.H., FITTON, J.E., WUTHRICH, K.

Nuclear magnetic resonance investigation of the conformation of δ -hémolysine bound to dodecylphosphocholine micelles.

Biochim Biophys Acta, 1987, **911** : 144-153.

LEE, C.S., OUTERIDGE, P.M.

Leucocytes of sheep colostrums, milk and involution secretion, with particular reference to ultrastructure and lymphocyte subpopulations.

J Dairy Res, 1981, **48** : 225-237.

LEE, C.S., OUTERIDGE, P.M.

The identification and ultrastructure of macrophages from the mammary gland of ewe.

Ajebak, 1976, **54** : 43-55.

LOHUIS, J.A.C.M., BERTHELOT, X., CESTER, C. et al.

Pharmacokinetics and milk residues of penicillin, nafcillin and dihydrostreptomycin in dairy sheep treated with nafenpal DC at drying off.

In : Proceedings of the Symposium on residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk, Kiel, Germany, 1995, pp 64-68.

MARRACK, P., KAPPLER, J.

The staphylococcal enterotoxins and their relatives.

Science, 1990, **248** : 705-711.

MATSUNAGA, T., KAMATA, S., KAKIICHI, N. et al.

Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic mastitis in farms.

J Vet Med Sci, 1993, **55** (2) : 297-300.

MIETHKE, T., DUSCHEK, K., WAHL, C. et al.

Pathogenesis of toxic shock syndrome : T cell mediated lethal shock caused by the superantigen TSST-1.

Eur J Immunol, 1993, **23** : 1294-1500.

MITCHELL, M.D., COHEN, L.

Staphylococcus aureus : biology, mechanisms of virulence, epidemiology.

The Journal of Pediatrics, 1986, **108** (5, part 2) : 796-799.

MORGANTE, M., RANUCCI, PAUSELLI, M. et al. (Morgante et al., 1996 a)

Total and differential cell count by direct microscopic method on ewe milk.

J Vet Med, 1996, **A43** : 451-458.

MORGANTE, M., RANUCCI, S., PAUSELLI, M. et al. (Morgante et al., 1996 b)

Total and differential cell count in milk of ewes during lactation

In : Rubino, R. (Ed), Proceedings of Somatic cells and milk of Small Ruminants, International Symposium, Bella, Italy

Wageningen Pers, The Netherlands, 1996, pp 41-45.

MORGANTE, M., RANUCCI, PAUSELLI, M. et al. (Morgante et al., 1996 c)

Total and differential cell count in milk of primiparous Comisana ewes without signs of mastitis.

Small Ruminants Res, 1996, **21** : 265-271.

MORIN, E., FRAYSSE, J.

Les systèmes ovin lait en France – Diversité des systèmes d'exploitation, Repères techniques et économiques – Document de synthèse rédigé par Emmanuel Morin de l'institut de l'élevage avec la collaboration de Joël Fraysse et des techniciens impliqués dans les dispositifs régionaux
2003

MORONI, P., CUCCURU, P.

Relationship between mammary gland infections and some milk immune parameters in Sardanian breed ewes.
Small Ruminants Res, 2001, **41** : 1-7.

NEWBOUD, F.K.

Antibiotic treatment of experimental *Staphylococcus aureus* infections of the bovine mammary gland.
Can J Com Med, 1974, **38** : 411.

NICKERSON, S.C., HEALD, C.W.

Histopathologic response of the bovine mammary gland to experimentally induced *Staphylococcus aureus* infection.
Am J Vet Res, 1981, **42** (8) : 1351-1355.

OHLSSEN, K., KOLLER, K.P., HACKER, J.

Analysis of the expression of the alpha-toxin (*hla*) of *Staphylococcus aureus* by using a chromosomally encoded *hla* : *lac Z* gene fusion.
Infect Immun, 1997, **65** : 3606-3614.

OUTTERIDGE, P.M.

Local Immunity.

In : OUTTERRIDGE, P.M. Veterinary Immunology. Ville d'édition : éditeur commercial, 1985, 95-102.

PASQUALATTO, D., ABBINANTE, F.

Massive toxic exposure to contaminated food with *S. aureus*.
Toxicology letters, 1998, **95** (1) : 158.

PREVOST, G., CRIBIER, B., COUPPIE, P. et al.

Panton-Valentine leukocidin and gamma hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATTC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities.
Infect Immun. 1995, **63** : 4121-4129.

RAINARD, P., CORRALES, J.C., BARRIO, M.B. et al.

Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes and goats with mastitis : importance of LukM/LukF'-PV leukotoxin.
Clin Diagn Lab Immunol, 2003, **10** (2) : 272-277.

RANUCCI, S., MORGANTE, M.

Sanitary control of the sheep udder: total and differential cell count in milk.

In : Barillet, F., Zervas, N.P. (Eds), Proceedings of the 6th International Selection on the Milking of Small Ruminants. Milking and milk production of dairy sheep and goats, Athens, Greece

Wageningen Pers, The Netherlands, 1999, pp 5-13.

RUPP, R., BERGONIER, D., DION, S.

Effects of SCC-based selection for mastitis resistance: first results from a divergent selection experiment in sheep.

First Results from a Divergent Selection Experiment in Sheep.

In : "8th World Congress on Genetics applied to Livestock production", Belo Horizonte, Brazil, August 13-18 2006.

RUPP, R., BOICHARD, D.

Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle.

Vet Res, 2003, **34** : 671-688.

SCHUBERTH, H.J., KRUEGER, C., ZERBE, H. et al.

Characterization of leukocytotoxic and superantigen-like factors produced by *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis.

Vet Microbiol, 2001, **82** (2) : 187-99.

SEARS, P.M., SMITH, B.S., ENGLISH, P.B. et al.

Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from Bovine intramammary infections.

J Dairy Sci, 1990, **73** : 2785-2789.

SEEGER, W., BAUER, M., BHAKDI, S.

Staphylococcal alpha-toxin induced vascular leakage in isolated perfused rabbit lungs.

Lan Investig, 1990, **63**: 341-349.

SEVI, A., MASSA, S., ANNICCHIARICO, G. et al.

Effect of stocking density on ewes' milk yield, udder health and microenvironment.

J Dairy Res, 2001, **84** : 2632-2640.

SEVI, A., TAIBI, L., ALBENZIO, M. et al.

Airspace effects on the yield and quality of ewe milk.

J Dairy Res, 1999, **66** : 489-499.

SIMEAO DO CARMO, L., SOUZA DIAS, R., ROBERTO LINARDI, V. et al.

Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil.

Food Microbiology, 2002. **19** (1) : 9-14.

SIQUEIRA, J.A., SPEEG-SCHATZ, C., FREHAS, F.I.S., et al.

Channel-forming leucotoxins from *Staphylococcus aureus* causes severe inflammatory reactions in a rabbit eye model.

J Med Microbiol, 1997, **46** : 486-494.

SUTTORP, N., SEEGER, W., DEWEIN, E. *et al.*

Staphylococcal α -toxin-induced-PGI₂ in endothelial cells: role of calcium.

Am J Physiol. 1985, **248** : C127-C134.

WELLER, J.I., SARAN, A., ZELIGER, Y.

Genetic and environmental relationships among somatic cell count, bacterial infection and clinical mastitis.

J Dairy Sci, 1992, **75** : 2532-2540.

WOODIN, A.M.

Purification of two components of leukocidin from *Staphylococcus aureus*.

Biochem J, 1960, **75** : 158-165.

Liste des abréviations -

CCS : Comptage des cellules somatiques.

CCT : Comptage cellulaire de tank.

CMT : « Californian Mastitis Test ».

ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

HACCP : « Hazard Analysis and Critical Control Points » (analyse des risques-points critiques pour leur contrôle).

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique.

LIAL : Laboratoire Interprofessionnel d'Analyse Laitière.

PMN : Polymorphonucléaires neutrophiles.

PTSag : “Pyrogenic toxin superantigen”.

SCS : Somatic cell score (score des cellules somatiques).

SCN : Staphylocoques à Coagulase Négative.

SE : « Staphylococcic enterotoxins » (entérotoxines staphylococciques)

QTL : « Quantitative Trait Loci ».

Toulouse, 2007

NOM : DEVERRIERE

Prénom : Béatrice

TITRE : Reproduction expérimentale de mammites à *Staphylococcus aureus* chez la brebis : comparaison de lignées génétiques divergentes pour les comptages cellulaires.

RESUME : L'objectif de ce travail était de comparer la réponse de brebis laitières appartenant à deux lignées génétiques divergentes pour les comptages cellulaires du lait à des inoculations intra-mammaires de *Staphylococcus aureus*. Pour les deux essais, une souche ovine de *S. aureus* de génotype connu et « hypovirulente » pour la mamelle de la brebis a été inoculée dans la citerne glandulaire d'une hémimamelle par brebis. Le premier essai (10^3 UFC) a montré une différence nette entre les deux lignées, en particulier au plan clinique : la lignée basse s'est avérée plus sensible. Le second essai (15 UFC) a produit des résultats hétérogènes à l'intérieur d'un lot et plus équilibrés d'un lot à l'autre aux plans clinique, bactériologique et cellulaire. Associés aux faibles effectifs des lots, ces éléments ne permettent pas de conclure quant à la plus grande sensibilité d'une lignée ou de l'autre vis-à-vis des infections intra-mammaires à *S. aureus*. Ces premiers résultats, ainsi que les suites à donner, sont discutés en particulier au plan méthodologique pour la reproduction expérimentale de mammites dans les conditions les plus proches possibles des conditions naturelles.

MOTS-CLES : MAMMITES, BREBIS LAITIÈRES, SÉLECTION, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, REPRODUCTION EXPÉRIMENTALE, COMPTAGES CELLULAIRES.

TITLE : Experimental production of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy ewes : comparison of divergent lines for somatic cell counts.

ABSTRACT : The aim of this work was to compare two divergent ovine lines for milk somatic cell counts for the resistance to intra-mammary inoculation of *Staphylococcus aureus*. For the two experiments, an ovine genotyped, hypovirulent strain of *S. aureus* was inoculated intracisternally in one half-udder per ewe. During the first experiment (10^3 CFU), a clear difference was obtained between the two lines, especially from the clinical point of view, the low line being less resistant. During the second experiment (15 CFU), heterogeneous results within one line, and variable, inconclusive results from one line to the other were obtained at clinical, bacteriological and cellular levels. These data and the low number of ewes in the different groups did not allow to conclude about the respective resistance of these divergent lines to intra-mammary infections with *S. aureus*. These preliminary results and further experiments are discussed especially from the methodological point of view in order to perform mastitis experimental productions in conditions as close to the natural ones as possible.

KEYWORDS : MASTITIS, DAIRY SHEEP, SÉLECTION, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, EXPERIMENTAL PRODUCTION, SOMATIC CELL COUNT.