



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

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

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>  
Eprints ID : 2857

**To cite this document :**

Méchin, Pierre (2009) [Etude de la variabilité de la production d'anticorps après immunisation en relation avec une sélection génétique sur la réponse inflammatoire mammaire chez la brebis](#)  
Thesis

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

# ETUDE DE LA VARIABILITE DE LA PRODUCTION D'ANTICORPS APRES IMMUNISATION EN RELATION AVEC UNE SELECTION GENETIQUE SUR LA REPONSE INFLAMMATOIRE MAMMAIRE CHEZ LA BREBIS

---

## THESE

pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2009  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Pierre, Gabriel MECHIN**

Né le 20 mai 1983 à Talence (Gironde, 33)

---

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

---

## JURY

PRESIDENT :

**M. Antoine BLANCHER** Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

ASSESSEURS :

**M. Gilles FOUCRAS** Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

**Mlle Séverine BOULLIER** Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



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

**Directeur** : M. A. MILON

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

**Professeurs honoraires** :

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

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*  
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*  
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*  
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*  
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*  
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*  
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*  
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*  
M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*  
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistique, Modélisation*  
M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*  
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*  
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*  
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*  
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*  
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*  
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*  
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**INGENIEUR DE RECHERCHE**

M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique Equine*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*

M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

**MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)**

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*

M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*

Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*

M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*

Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*

Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*

Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*

M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*

Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*

M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*

Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*

M. **DOSSIN Olivier**, (DISPONIBILITE) *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*

M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*

M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*

M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*

M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*

Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*

M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*

M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*

M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*

Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*

M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*

M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

Mme **PRYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*

Mme **TROGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*

M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

**MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUEL**

Mlle **BUCK-ROUCH**, *Médecine interne des animaux de compagnie*

M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie du bétail*

M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*

M. **SEQUELA Jérôme**, *Médecine interne des animaux de compagnie*

M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

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

Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*

M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*

M. **GIN Thomas**, *Production et pathologie porcine*

M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*

M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*

M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*

Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*

# REMERCIEMENTS

## **A Monsieur le Professeur Antoine BLANCHER**

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

*Immunologie option biologique*

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

*Hommages respectueux.*

## **A Monsieur le Docteur Gilles FOUCRAS**

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pathologie du bétail*

Qui nous a accompagnés tout au long de ce travail et nous a fait l'honneur et le plaisir d'accepter la direction de cette thèse.

*Qu'il trouve ici l'expression de toute notre gratitude.*

## **A Mademoiselle le Docteur Séverine BOULLIER**

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Immunologie générale et médicale*

Qui nous a confié ce travail et nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.

*Sincères reconnaissances.*

**A Monsieur le Docteur Fabien CORBIERE**

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Pathologie des ruminants*

Pour la réalisation des analyses statistiques de cette étude.

*Sincères remerciements.*

**A Christian TASCA et Cécile CAUBET, techniciens du laboratoire de microbiologie de l'ENVT**

Pour leur contribution et leur aide à la réalisation des dosages ELISA.

*Sincères remerciements.*

**A Monsieur le Docteur Thomas GIN**

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

*Production et pathologie porcine*

Pour sa participation à la collecte des références bibliographiques.

*Sincères remerciements.*

**A ma mère, Nelly MECHIN et ma sœur, Christelle COQUEREL**

Pour leur relecture et leurs conseils dans la rédaction de ce document.

*Sincères remerciements.*

## **A mes parents**

Pour leur admirable éducation et leur amour envers moi, pour leur soutien pendant ces années d'études, pour leur exemple. Je n'ose pas vous le dire souvent mais je vous aime.

## **A mon beau-frère et ma sœur, Eli et Christelle**

Pour tous ces merveilleux moments partagés à Toulouse, pour leur porte toujours ouverte. Pour leur trois magnifiques filles qui m'ont donné tant de joie. Vous êtes un modèle pour moi.

## **A ma sœur Myriam**

Pour le plaisir de ce que le temps nous ait rapproché, pour ton histoire et ta persévérance, un exemple de vie.

## **A mes amis d'école : Alex, Florian, Thomas, Nath, F-X, Bibi, Vincent**

En souvenir de tous ces bons moments passés ensemble, finalement 5 ans d'études c'est trop court ! Pour ton hospitalité à l'heure de l'apéro, pour le Ricard, les camemberts et les andouilles, un grand merci à toi Alex. Pour le plaisir de t'avoir comme voisin et de travailler avec toi, tu me manques Flo ! Pour ces inoubliables randos dans les Pyrénées, Thomas quand est-ce qu'on remet ça ?

## **A mes amis de l'église de Toulouse**

En souvenir de tout ce que nous avons vécu ensemble. Pour votre bonne humeur et votre amitié. J'ai construit en partie ma vie à vos côtés. Mention spéciale à Wiloo, Nicole, Thierry et Florence qui m'ont particulièrement entouré.

## **A mon cher ami David**

Nous avons écrit tant de belles pages de notre vie ensemble ! En souvenir de ton nez fracturé et de ma cicatrice à la paupière ; ici ou ailleurs, maintenant ou plus tard, tu es le frère dont j'ai rêvé.

## **A ma femme, Emeline**

Pour ta tendresse, ton amour, ton caractère, pour le privilège et le bonheur que j'ai à partager ta vie. Pour notre histoire, notre amitié passée, notre amour présent et tout ce qui nous attend encore. Je t'aime très fort !

## **A Celui pour qui j'ai la plus grande gratitude, Jésus-Christ**

Parce qu'il est mon Dieu Sauveur mais aussi mon ami, mon modèle, ma source d'inspiration et ma raison de vivre. Notre histoire ne s'arrêtera jamais !

## **A toutes les autres personnes qui comptent tant pour moi**

Il y aurait tant à écrire mais ce document est déjà bien volumineux...

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION .....	11
1. La sélection génétique dans la lutte contre les mammites .....	11
Sélection divergente sur le critère CCS.....	12
2. L'immunité mammaire .....	15
2.1. Facteurs anatomiques et tissulaires .....	15
2.1.1. Le flux de lait .....	15
2.1.2. L'obturation du canal .....	15
2.1.3. L'épithélium mammaire .....	17
2.2. Facteurs solubles.....	18
2.2.1. Complément .....	18
2.2.2. Lactoferrine.....	18
2.2.3. Transferrine .....	19
2.2.4. Lysozyme .....	19
2.2.5. Lactoperoxydase .....	19
2.2.6. Xanthine oxydase .....	19
2.2.7. Peptides de défense de l'hôte .....	20
2.2.8. Anticorps.....	20
2.3. Facteurs cellulaires.....	21
2.3.1. Neutrophiles .....	21
2.3.2. Macrophages.....	23
2.3.3. Lymphocytes .....	23
2.3.4. Cellules tueuses naturelles (NK) .....	24
2.3.5. Cellules épithéliales mammaires .....	24
2.4. Résumé et problématique.....	25
3. Les anticorps : définition, origine et fonctions .....	26
3.1. Nature des anticorps.....	26
3.2. Origine des anticorps.....	29
3.2.1. Activation du lymphocyte B.....	29
3.2.2. Sélection de lymphocytes B de meilleure affinité pour l'antigène ....	30
3.2.3. Commutation de classe .....	32
3.2.4. Différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et lymphocytes B mémoires.....	32
3.3. Fonctions des anticorps.....	33
3.3.1. Neutralisation.....	33
3.3.2. Opsonisation.....	34
3.3.3. Activation du complément.....	35
3.4. Conclusion.....	36
MATERIELS ET METHODES .....	38
1. Animaux .....	38
2. Immunisation .....	39
3. Stimulation intra-mammaire .....	39
4. Stimulation systémique en phase mémoire.....	40
5. Dosage des anticorps spécifiques dans le sérum.....	40
5.1. Obtention du sérum .....	40
5.2. ELISA .....	40
6. Dosage des anticorps présents dans le lait.....	41
6.1. Obtention du lactosérum.....	41
6.2. ELISA .....	41

7.	Analyse statistique.....	41
7.1.	Modèle statistique en phase d'immunisation .....	42
7.2.	Modèle statistique après stimulation intra-mammaire.....	42
7.3.	Modèle statistique après stimulation systémique en phase mémoire ....	43
RESULTATS.....		44
1.	Réponse anticorps pendant et après immunisation .....	44
1.1.	Intensité de la réponse anticorps en phase d'immunisation .....	44
1.2.	Variation de la réponse anticorps en fonction du stade de gestation.....	47
1.3.	Intensité de la réponse anticorps en phase mémoire .....	49
2.	Réponse anticorps dans le sérum après stimulation antigénique intra-mammaire .....	50
3.	Réponse anticorps dans le lactosérum après stimulation antigénique intra-mammaire .....	52
4.	Analyse statistique : recherche des effets statistiquement significatifs .....	53
4.1.	En phase d'immunisation.....	53
4.1.1.	Variation du titre en anticorps .....	53
4.1.2.	Effet de la lignée CCS .....	53
4.1.3.	Effet du stade de gestation .....	54
4.2.	En phase mémoire.....	54
4.3.	Après stimulation antigénique intra-mammaire.....	55
4.3.1.	Anticorps du sérum.....	55
4.3.2.	Anticorps du lactosérum .....	55
DISCUSSION.....		57
1.	Analyse des résultats .....	57
1.1.	Analyse des échantillons de sérum et de lactosérum .....	57
1.2.	Effectifs.....	58
1.3.	Antigène modèle.....	58
1.4.	Génération et cohorte de naissance .....	58
2.	Effet de la gestation sur la réponse immunitaire .....	59
2.1.	Observations publiées .....	59
2.2.	Interprétation.....	61
3.	Variabilité génétique de la réponse humorale .....	62
3.1.	Rappel des résultats .....	62
3.2.	Observations publiées .....	62
3.2.1.	Chez les ruminants.....	62
3.2.2.	Chez le porc .....	64
3.2.3.	Chez le poulet.....	64
3.2.4.	Chez la souris.....	65
3.2.5.	Chez l'homme.....	66
3.3.	Interprétation.....	66
3.3.1.	Déterminisme génétique de la réponse humorale .....	66
3.3.2.	Relation entre réponse humorale et CCS.....	67
4.	Réponse immunitaire humorale et lignée CCS .....	68
4.1.	Interactions entre anticorps et CCS.....	68
4.2.	Perspectives .....	70
5.	Conclusion .....	73
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		75
ANNEXE 1 : Calendrier expérimental .....		79
ANNEXE 2 : Effectifs des brebis .....		80
ANNEXE 3 : Protocole ELISA pour le dosage des IgG anti-ovalbumine .....		81
ANNEXE 4 : Résultats bruts.....		84

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## Liste des graphiques

Figure 1 : Principe de la sélection divergente sur le critère CCS .....	13
Figure 2 : Anatomie de la glande mammaire.....	16
Figure 3 : Anatomie de l'extrémité du trayon.....	17
Figure 4 : Recrutement et fonctions des granulocytes neutrophiles.....	22
Figure 5 : Structure de l'anticorps .....	27
Figure 6 : Déclenchement de la production des anticorps.....	29
Figure 7 : Activation des lymphocytes B.....	30
Figure 8 : Sélection de lymphocytes B de plus grande affinité pour l'antigène.....	31
Figure 9 : Neutralisation des bactéries .....	33
Figure 10 : Opsonisation d'une bactérie .....	34
Figure 11 : Rôle des opsonines .....	35
Figure 12 : Activation de la voie classique du complément par les IgM et les IgG ....	35
Figure 13 : Déroulement de la réponse immunitaire humorale.....	37
Figure 14 : Calendrier expérimental.....	38
Figure 15 : Evolution de la quantité d'anticorps spécifiques au cours de l'immunisation.....	44
Figure 16 : Quantités d'anticorps produites au cours de l'immunisation, après transformation logarithmique .....	45
Figure 17 : Distribution des quantités d'anticorps mesurées à J14 .....	46
Figure 18 : Distribution des quantités d'anticorps mesurées à J28 .....	46
Figure 19 : Distribution des quantités d'anticorps mesurées à J111 .....	47
Figure 20 : Réponses anticorps à J14 et J28 en fonction du stade de gestation .....	48
Figure 21 : Réponses anticorps moyennes (J14, J28) en fonction du stade de gestation .....	48
Figure 22 : Réponses anticorps après stimulation antigénique en phase mémoire ..	49
Figure 23 : Réponses anticorps en phase mémoire après transformation logarithmique .....	50
Figure 24 : Titres sériques en anticorps après stimulation antigénique intra- mammaire.....	51
Figure 25 : Réponses sériques après transformation logarithmique .....	51
Figure 26 : Titres en anticorps dans le lactosérum après stimulation antigénique intra-mammaire .....	52
Figure 27 : Titres en anticorps dans le lactosérum après stimulation antigénique intra-mammaire, après transformation logarithmique .....	53

## Liste des tableaux

Tableau 1 : SCS moyens des lignées CCS+ et CCS- sur les lactations 2005-2006 .	14
Tableau 2 : Fonctions et répartition des différents isotypes d'immunoglobulines.....	27
Tableau 3 : Rôle des cytokines dans l'expression des isotypes d'immunoglobulines	32

# INTRODUCTION

## 1. La sélection génétique dans la lutte contre les mammites

Dans les filières laitières, les mammites sont les affections les plus fréquentes des animaux adultes. Une mammite est une inflammation de la mamelle provoquée par la colonisation ascendante d'une ou plusieurs glande(s) mammaire(s) par un agent infectieux, le plus souvent bactérien. La lutte contre ces infections est une priorité pour les producteurs, car les pertes économiques qui sont liées à leurs effets sont considérables. Parmi ceux-là on peut citer entre autres une diminution de la production et de la qualité du lait, une augmentation des frais médicamenteux et vétérinaires, la mortalité provoquée par certaines de ces infections et la réforme anticipée des animaux chroniquement infectés, ajouté au surplus de travail et à l'altération du bien-être animal. Les mammites tiennent donc la première place parmi les problèmes de santé du cheptel laitier (Kossaibati, 1997).

La lutte contre les mammites est possible grâce aux traitements médicamenteux et grâce à des mesures préventives. Pour le traitement des infections mammaires, les antibiotiques sont massivement utilisés ; la question de la sélection des résistances bactériennes à long terme est souvent posée, même si à l'heure actuelle elle n'a jamais été formellement prouvée dans ce cadre. La prévention repose essentiellement sur trois approches : la gestion de l'environnement d'élevage, l'hygiène de la traite et l'entretien du matériel de traite. Pour l'environnement, l'éleveur doit respecter les règles d'hygiène des locaux et de surface disponible pour les animaux afin que la pression d'infection reste en dessous d'une certaine limite. Il doit aussi veiller aux conditions d'ambiance du bâtiment, comme la température et l'hygrométrie. En salle de traite, la mamelle doit être nettoyée soigneusement avant la traite et recevoir un traitement antiseptique après la traite (post-trempage). La machine à traire doit être nettoyée et désinfectée après chaque utilisation, et son réglage contrôlé régulièrement ; il est aussi très important de renouveler régulièrement certains articles comme les manchons trayeurs.

Cependant, malgré l'application stricte des mesures de traitement et de prévention, l'incidence des infections mammaires reste élevée. Il est évident que de nouvelles

approches doivent compléter le dispositif de lutte. La vaccination est en cours de développement, mais son efficacité reste encore insuffisante.

Un des axes envisagés récemment consiste à augmenter la résistance naturelle des ruminants laitiers aux mammites. Les mécanismes de défense de la glande mammaire contre les infections regroupent à la fois des facteurs anatomiques, solubles et cellulaires que nous présenterons plus loin. C'est l'efficacité de ces mécanismes qui limite la capacité d'une bactérie à provoquer une infection intramammaire et contrôle l'issue de cette infection.

La sélection génétique est probablement une méthode de choix pour augmenter le niveau de résistance du cheptel laitier. Etant donné que le comptage de cellules somatiques (CCS) dans le lait est très bien corrélé sur le plan génétique avec la fréquence des infections mammaires chez un animal donné, il constitue un critère intéressant à inclure dans les programmes de sélection des ruminants laitiers (Weller, 1992).

Notre étude a été réalisée chez des brebis laitières de race Lacaune obtenues à la suite d'une sélection génétique divergente basée sur la concentration en cellules somatiques (CCS) dans le lait. Le CCS moyen pendant la lactation est un indicateur de mammites chronique et donc de la sensibilité de la brebis aux infections de la mamelle. Dans le chapitre suivant, nous présentons cette sélection en reprenant les principales informations.

### **Sélection divergente sur le critère CCS**

Le protocole et les résultats de la sélection divergente font l'objet d'un article récemment publié par Rupp et coll. (Rupp, 2009). Le programme a débuté en 2003 et l'objectif était de créer une sélection divergente sur un critère facile à mesurer, le CCS moyen pendant la lactation, le niveau de production laitière étant équivalent entre tous les animaux. La sélection, dont le principe est illustré à la figure 1, a été appliquée à la fois aux mâles et aux femelles, même si elle est moindre pour ces dernières.

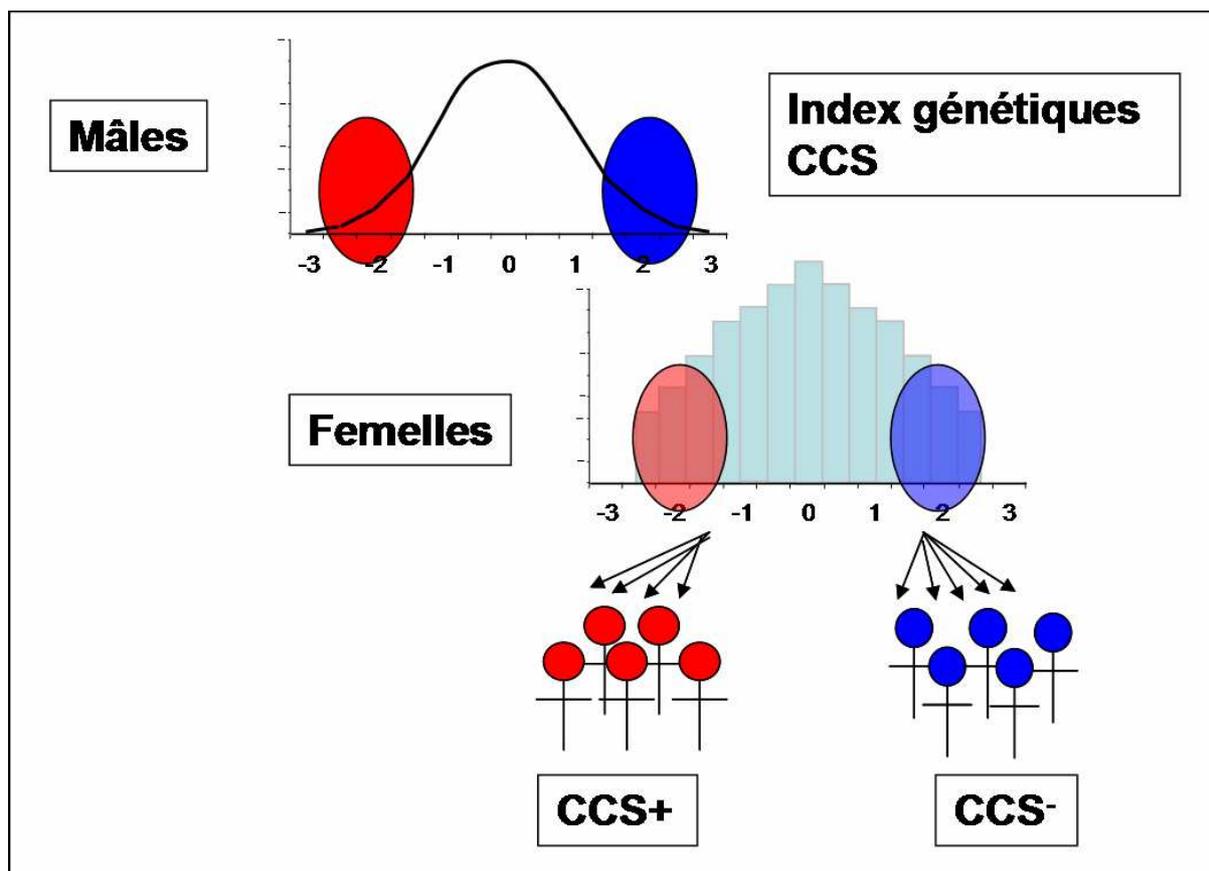


Figure 1 : Principe de la sélection divergente sur le critère CCS

Deux groupes de 7 béliers ont été sélectionnés parmi l'ensemble des mâles disponibles dans les unités de sélection ovines. Les animaux ont été choisis en fonction de leur index génétique pour les CCS, parmi ceux qui avaient des valeurs extrêmes et fiables (coefficient de détermination (CD)  $\geq 0,70$ ), les index génétiques pour la production laitière étant favorables – ces animaux sont donc améliorateurs pour la quantité de lait produite – et similaires entre les deux groupes de la sélection. Chaque bélier a été utilisé pour l'insémination d'un groupe de 13 brebis en moyenne, qui avaient elles aussi été choisies en fonction de l'index CCS.

Un total de 114 agnelles a été obtenu. Les deux lignées sont désignées CCS+ pour les brebis ayant des index CCS défavorables (groupe sensible), et CCS- pour les brebis ayant les taux cellulaires les plus faibles (groupe résistant). Après insémination à l'âge de 8 mois, 84 d'entre elles ont commencé une première lactation en 2005 : 46 pour le groupe CCS+, et 38 pour le groupe CCS-. Au cours de cette lactation, différents paramètres ont été mesurés sur le lait tels que la quantité, la composition pour la matière protéique et la matière grasse, le comptage de

cellules somatiques (CCS) et la présence de bactéries. Les mammites cliniques et les modifications de la glande mammaire liées aux infections chroniques ont également été enregistrées.

Pour l'analyse statistique, les CCS ont subi une transformation logarithmique pour obtenir un score (SCS), ce qui permet de normaliser la distribution des données. Les SCS moyens des deux lignées de brebis sont présentés dans le tableau ci-dessous. Comme attendu, on constate une forte divergence entre les brebis du groupe CCS+ et celles du groupe CCS-.

**Tableau 1 : SCS moyens des lignées CCS+ et CCS- sur les lactations 2005-2006**

Lignée	Lactation 2005 *10 <sup>3</sup> cellules/ml	Lactation 2006 *10 <sup>3</sup> cellules/ml
CCS+	4,48 (SD = 2,15)	4,86 (SD = 2,90)
CCS-	2,89 (SD = 1,70)	2,16 (SD = 1,95)

A l'issue de la première lactation, les deux lignées ont une sensibilité vis-à-vis des mammites qui est très différente entre les deux groupes, comme l'indiquent les concentrations cellulaires individuelles. Que l'on considère les mammites cliniques aiguës ou chroniques, ou seulement les mammites sub-cliniques, les brebis du groupe CCS- possèdent une plus grande résistance, ou bien un meilleur taux de guérison.

Face à ces différences de capacité de la mamelle à lutter contre les infections bactériennes et à l'efficacité de la sélection divergente, il devient pertinent de poser la question des mécanismes sous-jacents à la résistance : quels effecteurs immunitaires ont été sélectionnés en même temps que le critère CCS et qui confèrent à l'organisme une plus grande capacité à limiter la colonisation de la glande mammaire par des germes pathogènes et/ou à éliminer ces bactéries ?

Avant d'aborder la partie expérimentale de notre travail, nous allons synthétiser les connaissances à propos des mécanismes de défense de la glande mammaire.

## 2. L'immunité mammaire

Les mécanismes de défense de la glande mammaire sont encore en grande partie méconnus, malgré les nombreux travaux de recherche qui ont été effectués sur le sujet. Ces mécanismes font appel à des facteurs anatomiques et tissulaires, des facteurs solubles présents dans le lait et des facteurs cellulaires. Nous avons synthétisé ici les connaissances actuelles collectées essentiellement dans l'espèce bovine, et qui ont fait récemment l'objet de revues (Rainard, 2006 ; Sordillo, 1997).

La plupart de ces connaissances sont transposables aux autres espèces laitières comme les ovins et les caprins car la physiopathologie des mammites est très proche entre les espèces de ruminants.

La figure 2 (au verso de cette page) rappelle l'anatomie de la glande mammaire.

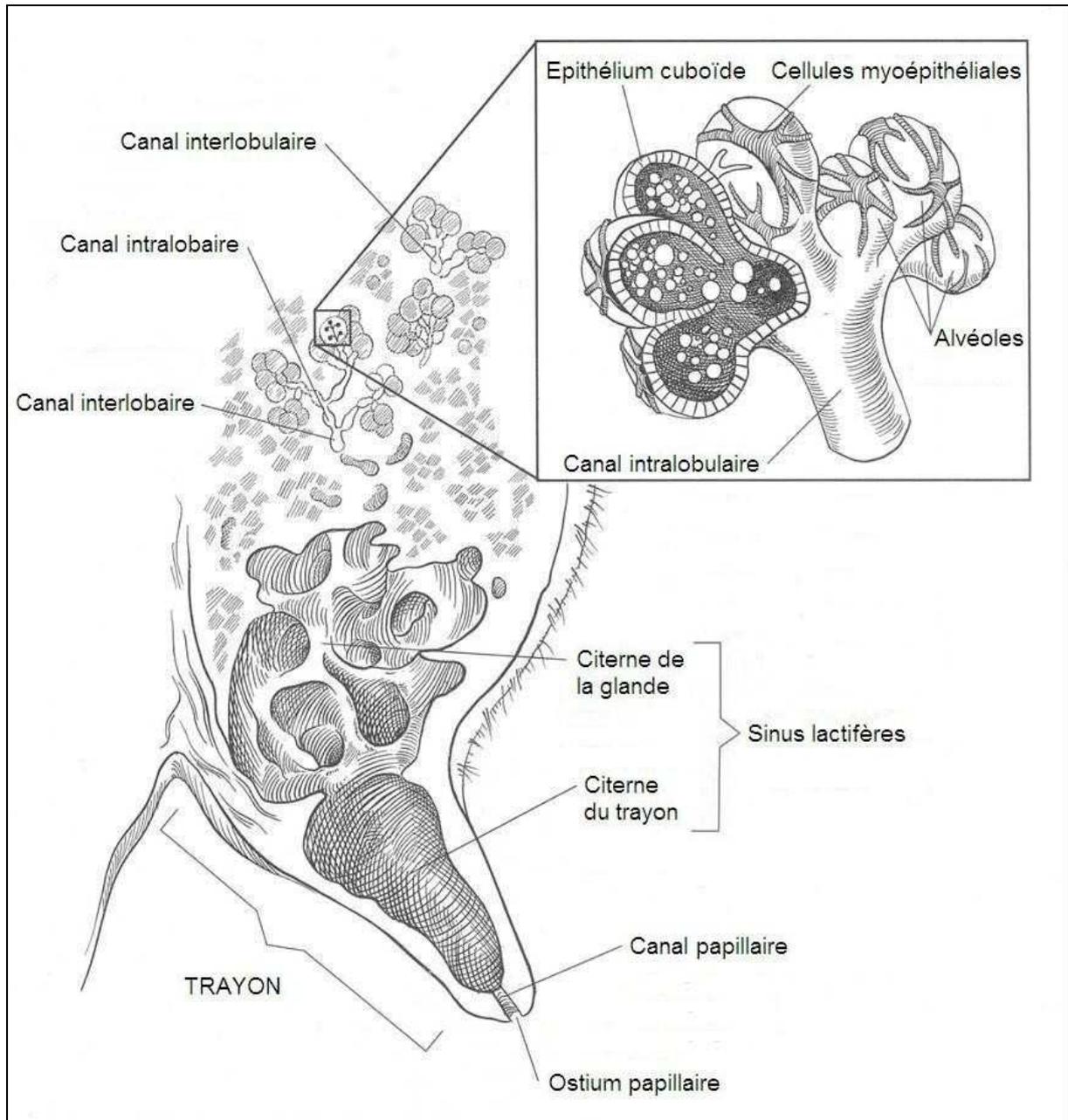
### 2.1. Facteurs anatomiques et tissulaires

#### 2.1.1. Le flux de lait

Le premier mécanisme qui prévient la colonisation ascendante de la mamelle par des bactéries est le flux de lait. En effet, à chaque traite (ou à chaque tétée par le jeune), le lait contenu dans la glande est expulsé et entraîne avec lui les germes qui ont réussi à entrer dans la glande à travers le canal du trayon.

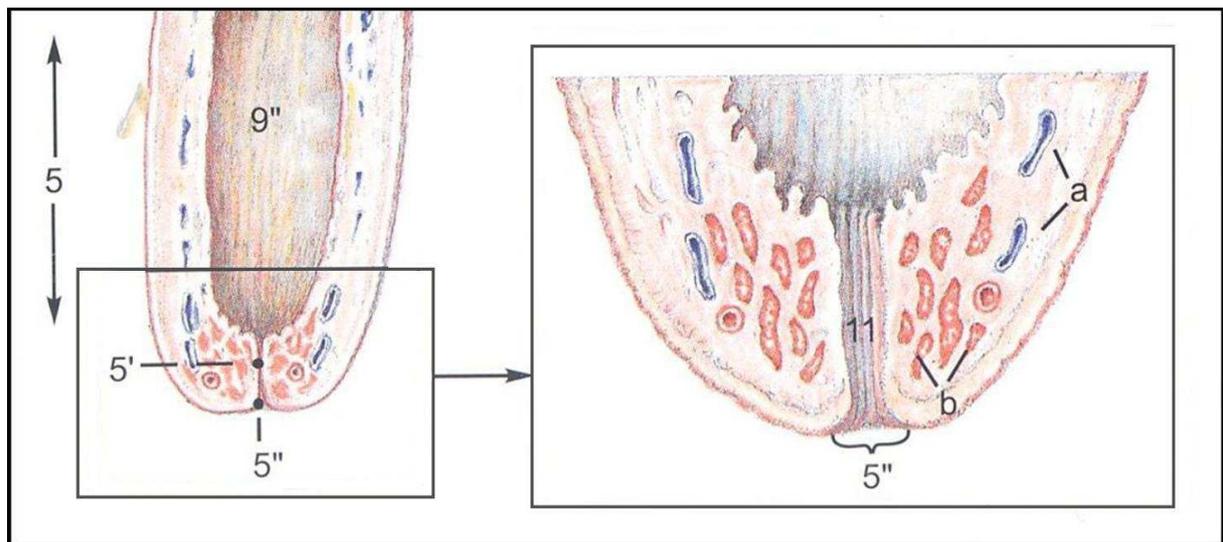
#### 2.1.2. L'obturation du canal

L'extrémité du trayon (figure 3) est la première ligne de défense contre les infections mammaires, car les bactéries doivent traverser le canal du trayon avant de coloniser la glande mammaire.



**Figure 2 : Anatomie de la glande mammaire**

(Traduit de *Anatomy and Physiology of Farm Animals*, 6th edition, R.D. Frandson, W.L. Wilke, A.D. Fails, p417)



**Figure 3 : Anatomie de l'extrémité du trayon**

Extrémité du trayon (5). La citerne du trayon (9'') se termine par un canal (5'). L'orifice (5'') du canal est maintenu fermé par le muscle sphincter du trayon (b). On observe aussi les sinus veineux du trayon (a) et les plis longitudinaux (11) du canal. (D'après Bovine Anatomy, An Illustrated Text, 1st edition, K.-D. Budras, R.E. Habel, p89)

Après la traite, le sphincter du trayon se referme dans un délai inférieur à deux heures ; il assure ainsi l'obturation du trayon et prévient la colonisation bactérienne.

De plus, le canal du trayon est tapissé de kératine pendant la lactation, ce qui limite l'adhésivité des germes ; la kératine participe ensuite à la formation d'un bouchon pendant la période sèche, qui joue le rôle d'obturateur et complète le dispositif sphinctérien.

La kératine joue donc le rôle de barrière physique, mais elle peut aussi lier et immobiliser la plupart des germes non encapsulés responsables de mammites ; elle contient des composés bactériostatiques ou bactéricides.

### 2.1.3. L'épithélium mammaire

L'épithélium qui tapisse les alvéoles de la glande mammaire est rendu imperméable, pendant la lactation, par des jonctions serrées qui relient les cellules épithéliales entre elles. Ainsi, le milieu interstitiel est relativement isolé du lait ce qui empêche la pénétration des germes plus en avant dans le tissu mammaire.

## 2.2. Facteurs solubles

### 2.2.1. Complément

Le complément est un système physiologique complexe qui est constitué de plusieurs molécules présentes dans le sérum. On en retrouve de faibles quantités dans le lait produit par une glande saine. Cependant, lors de mammite, l'inflammation s'accompagne d'une exsudation plasmatique souvent marquée qui augmente la concentration de ce composé dans le lait. L'action du complément est déclenchée par le contact avec un agent initiateur. Il se produit alors une cascade de réactions enzymatiques qui aboutissent d'une part à la libération de substances actives (C3b et C5a), d'autre part à la formation du complexe d'attaque membranaire qui peut détruire certaines bactéries.

Le composé C3b se fixe à la surface des bactéries et facilite l'action des cellules phagocytaires ; ce phénomène s'appelle l'opsonisation. Le composé C5a intervient dans la régulation de l'inflammation. Il est connu pour ses propriétés chimiotactiques et activatrices vis-à-vis des neutrophiles, mais on ne sait pas si ces propriétés interviennent dans le déclenchement ou dans l'amplification de la réponse inflammatoire de la glande mammaire.

Le complément est donc l'un des principaux facteurs solubles associés aux mécanismes de protection de la mamelle ; cependant on connaît mal le détail de sa contribution à la réaction inflammatoire globale. Par exemple, certains anticorps peuvent activer le complément, comme nous le verrons dans un prochain paragraphe, mais leur concentration dans le lait reste faible comparée à celle que l'on trouve dans le sérum (Rainard, 2003).

### 2.2.2. Lactoferrine

La lactoferrine est une protéine qui exerce plusieurs fonctions dans la réponse inflammatoire ; cependant son implication lors de mammite n'est pas encore démontrée. Premièrement, elle est un chélateur du Fer ce qui en fait un agent bactériostatique, notamment vis-à-vis de *Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus*. Deuxièmement, elle possède une activité bactéricide due à l'action de fragments amphipolaires qui se lient aux membranes bactériennes et les désorganisent. Cette activité pourrait être déclenchée lors de l'infection par des

germes produisant des protéases qui permettent la libération des fragments bactéricides. Troisièmement, la lactoferrine a une forte affinité pour le lipopolysaccharide (LPS) bactérien qui est responsable d'une forte réaction inflammatoire. Elle a donc également une activité anti-inflammatoire.

La lactoferrine est présente en faible quantité dans le lait, et c'est surtout pendant la période sèche qu'elle devient abondante dans les sécrétions mammaires, ainsi que lors des mammites aiguës où la production laitière diminue fortement. C'est dans ces conditions que la lactoferrine est supposée jouer un rôle protecteur de la mamelle.

### **2.2.3. Transferrine**

La transferrine est également une protéine chélatrice du fer. Elle est présente en faible quantité dans le lait issu d'une mamelle saine, mais lors de mammite, l'exsudation plasmatique fournit une grande quantité de transferrine qui a des propriétés bactériostatiques.

### **2.2.4. Lysozyme**

Le lysozyme est une protéine bactéricide qui agit par clivage des peptidoglycanes des parois bactériennes. Il n'est cependant pas considéré comme un élément essentiel de la défense de la glande mammaire.

### **2.2.5. Lactoperoxydase**

En présence de thiocyanate et de peroxyde d'hydrogène, la lactoperoxydase possède un effet bactériostatique ou bactéricide envers la plupart des germes responsables de mammites. Cependant le lait présente une faible tension en oxygène, ce qui limite l'efficacité de cette enzyme.

### **2.2.6. Xanthine oxydase**

La xanthine oxydase est une enzyme localisée dans la membrane des globules gras du lait. Elle permet la formation de peroxy-nitrite à partir de nitrite inorganique, qui peut être produit par les bactéries ou par une autre enzyme, l'oxyde nitrique synthase, contenue notamment dans les macrophages et les neutrophiles.

Le peroxy-nitrite est un agent bactéricide puissant. Du fait de sa concentration dans le lait, la xanthine oxydase joue un rôle significatif. Par exemple, son action permet d'expliquer que le lait entier se conserve mieux que le lait écrémé.

### **2.2.7. Peptides de défense de l'hôte**

Ces peptides sont principalement produits par les cellules phagocytaires et les cellules épithéliales. Ils possèdent un rôle bactéricide au sein des cellules, dans les vacuoles phagocytaires. Cependant, une fois libérés dans le milieu extra-cellulaire, ils auraient surtout des propriétés immunomodulatrices et participeraient à la réaction inflammatoire.

### **2.2.8. Anticorps**

Les anticorps, aussi appelés immunoglobulines (Ig) sont les seuls facteurs solubles du lait à être spécifiques de l'agent pathogène, c'est-à-dire qu'ils reconnaissent précisément certains constituants de la paroi des germes. Ils peuvent être présents à l'état naturel ou bien être produits à l'issue d'une réaction immunitaire spécifique, dite à médiation humorale.

Un prochain paragraphe définira plus précisément ce que sont les anticorps et décrira en détail leur origine et leurs modes d'action.

Dans le lait issu d'une mamelle saine, la quantité d'anticorps est faible, mais après l'apparition d'une inflammation, l'exsudation plasmatique apporte suffisamment d'immunoglobulines pour qu'elles puissent exercer leurs fonctions.

Les isotypes impliqués dans la défense de la mamelle sont les IgM, les IgG (1 et 2) et les IgA. Chez les ruminants, la quantité d'IgA dans le colostrum et le lait est faible et l'isotype le plus abondant est l'isotype  $\gamma_1$ . Les différents isotypes d'anticorps exercent des fonctions effectrices différentes, comme nous le verrons un peu plus loin.

## 2.3. Facteurs cellulaires

En l'absence d'inflammation, le nombre de cellules somatiques présentes dans le lait est faible : l'indicateur CCS (comptage ou concentration de cellules somatiques) est inférieur à  $10^5$ /ml. Dès la survenue d'une inflammation, on constate un afflux de leucocytes dans le lait et la valeur du CCS peut très largement dépasser  $10^6$ /ml. Ces leucocytes jouent un rôle important dans la lutte contre l'infection, ce qui est mis en évidence par la relation entre leur recrutement (qualité, rapidité et intensité) et la sévérité de la mammite. Deux revues très complètes décrivent le rôle des leucocytes dans la protection de la mamelle. Celle de Burvenich et coll. (Burvenich, 2003) aborde en détails les différents facteurs liés à l'hôte qui influencent la biologie des granulocytes neutrophiles, de leur production à leur sénescence. De leur côté, Burton et Erskine (Burton, 2003) décrivent, d'une part les différentes étapes de l'intervention des neutrophiles, d'autre part la contribution des autres leucocytes et des anticorps qui sont nécessaires à l'élimination des infections mammaires.

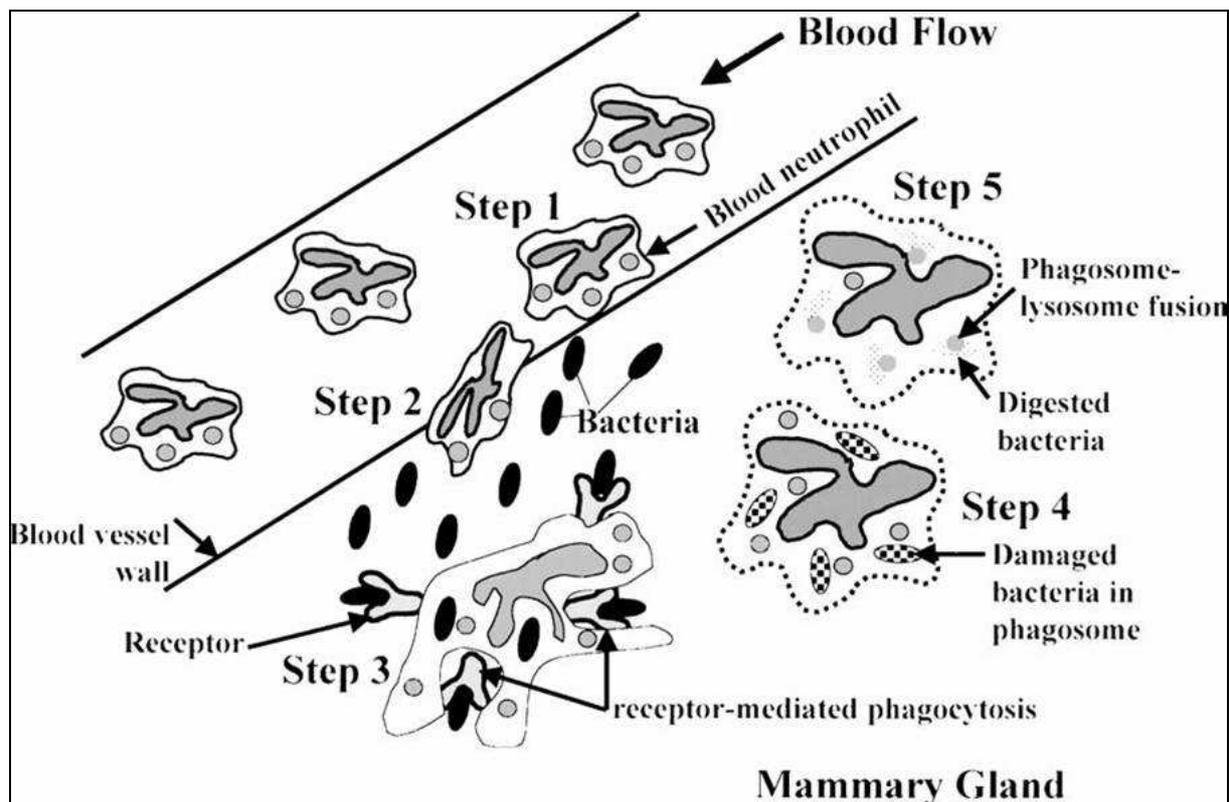
### 2.3.1. Neutrophiles

Les granulocytes neutrophiles (GNN), aussi appelés polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) ou simplement neutrophiles, sont des leucocytes spécialisés dans la lutte contre les bactéries. Dans le lait, ils représentent les principales cellules effectrices de l'immunité non spécifique : lors d'infection, ils phagocytent et détruisent les germes sans distinction de genre ou d'espèce.

Le rôle des neutrophiles recrutés dans la mamelle saine reste actuellement mal compris. En effet, leur quantité dans le lait est insuffisante pour que la phagocytose soit efficace. Cependant, des études à grande échelle ont montré que leur concentration est inversement corrélée au risque de mammite.

Lors d'infection, les neutrophiles sont les premières cellules recrutées dans le lait et ils deviennent rapidement la population cellulaire majoritaire : leur proportion dépasse alors 90% des leucocytes du lait.

Le recrutement et les fonctions des neutrophiles sont représentés dans la figure 4.



**Figure 4 : Recrutement et fonctions des granulocytes neutrophiles**

Les fonctions de surveillance et d'élimination des bactéries attribuées aux neutrophiles se déroulent en 5 étapes : margination (1), diapédèse et migration (2), endocytose (3), explosion respiratoire (4) et dégranulation (5). (D'après Burton, 2003)

L'afflux des phagocytes dans le site de l'inflammation est possible grâce à l'interaction de protéines membranaires exprimées par les cellules endothéliales et par les granulocytes eux-mêmes. Après avoir adhéré aux cellules endothéliales (étape 1), les neutrophiles quittent le compartiment sanguin par diapédèse et progressent dans le milieu extracellulaire (étape 2) en suivant un gradient de concentration de molécules chimiotactiques, notamment d'interleukine 8 (IL-8). Il est à noter que la rapidité et l'intensité de l'afflux de neutrophiles varient en fonction de la nature du pathogène. *Escherichia coli* déclenche un recrutement massif et rapide de neutrophiles et une mammite clinique aiguë, alors que *Staphylococcus aureus* est à l'origine d'un recrutement plus modéré et plus tardif qui apparaît 24 à 48 heures après l'infection.

Une fois arrivés au site de l'infection, les neutrophiles internalisent les germes par phagocytose (étape 3) ce qui déclenche une explosion respiratoire (respiratory burst, étape 4) produisant différents radicaux oxygénés qui exercent une première activité bactéricide. Enfin, la dégranulation (étape 5) permet la fusion des vésicules

phagocytaires avec les vésicules lysosomales. Ces dernières contiennent des enzymes qui assurent l'élimination finale des bactéries par digestion.

La contribution des polynucléaires neutrophiles à la lutte contre les germes est incontournable : la sévérité d'une mammites est inversement corrélée à la précocité et à l'intensité de leur intervention.

### **2.3.2. Macrophages**

Les macrophages représentent le type cellulaire le plus abondant dans le lait d'une glande saine chez la vache et la brebis. En tant que phagocytes, ils apportent une protection non spécifique directe contre les infections, mais leur rôle est surtout important pour l'initiation de la réponse inflammatoire. En tant que cellules présentatrices de l'antigène, ils participent au déclenchement de la réponse immunitaire adaptative. De plus, les macrophages, après phagocytose des bactéries, sécrètent des substances chimiotactiques pour d'autres types cellulaires, dont les neutrophiles.

L'autre fonction des macrophages survient à la fin de la réponse inflammatoire : ils assurent l'élimination des neutrophiles apoptotiques. Ce mécanisme est particulièrement important pour protéger la glande mammaire des dégâts induits par ces derniers.

### **2.3.3. Lymphocytes**

Les lymphocytes sont les cellules impliquées dans la réponse immunitaire adaptative. On distingue les lymphocytes T (LT) et les lymphocytes B (LB), qui remplissent des fonctions différentes.

Les lymphocytes B produisent les anticorps. Ils seront décrits en détail dans un prochain paragraphe.

Les LT CD4, aussi appelés LT auxiliaires ou « helpers », ont un rôle essentiel dans l'activation d'autres cellules immunitaires, comme les LT CD8, les LB, et les macrophages. Les LT CD8 cytotoxiques assurent l'élimination des cellules de l'organisme qui présentent des altérations dues par exemple à une infection

intracellulaire ou à un phénomène tumoral. Les LT CD8 suppresseurs, eux, diminuent l'intensité de la réponse immunitaire.

Contrairement au sang, le lait contient davantage de LT CD8 que de LT CD4. Ceci peut s'expliquer par le fait que les LT CD8 cytotoxiques permettraient l'élimination des cellules épithéliales mammaires altérées. Par ailleurs, la présence de LT CD8 suppresseurs en début de lactation pourrait expliquer la susceptibilité plus marquée des vaches aux infections mammaires à cette période.

A côté des LT CD4 et CD8 conventionnels, qui expriment un récepteur à l'antigène de type  $\alpha\beta$ , on trouve aussi dans la mamelle une quantité plus grande de LT  $\gamma\delta$  que dans le sang. Les LT  $\gamma\delta$  sont des lymphocytes ayant des fonctions cytotoxiques agissant au niveau des épithéliums, ce qui explique peut-être leur abondance dans cet organe.

#### **2.3.4. Cellules tueuses naturelles (NK)**

Les cellules tueuses naturelles, aussi appelées « Natural Killer (NK)» ou cellules NK, sont des lymphocytes qui exercent une activité particulière : la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). Contrairement au lymphocyte T CD8, le fonctionnement de la cellule NK est indépendant du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) : il est déclenché par la reconnaissance d'anticorps fixés sur une cellule. Comme les LT CD8, les cellules NK éliminent les cellules du soi altérées ; elles possèdent en outre une activité antibactérienne directe. L'importance de ces cellules dans la protection de la mamelle est encore mal connue.

#### **2.3.5. Cellules épithéliales mammaires**

Ces cellules sont importantes car elles forment l'épithélium qui borde le tissu mammaire et le sépare du lait. Elles sont donc en contact direct avec les bactéries lors d'infection.

Les cellules épithéliales mammaires exprimeraient les récepteurs membranaires appelés TLR (Toll Like Receptor). Ces récepteurs leur permettent de reconnaître les constituants des bactéries qui sont présentes dans la lumière de la glande ; elles sont aussi capables de sécréter diverses substances immunomodulatrices comme

des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 et IL-6), des substances chimiotactiques appelées chémokines (IL-8 ou CXCL8 notamment), et des peptides de défense de l'hôte. Si la contribution des cellules épithéliales mammaires au recrutement des leucocytes n'a pas été démontrée à ce jour, il est probable qu'elles jouent un rôle, notamment vis-à-vis des neutrophiles.

## 2.4. Résumé et problématique

Nous avons présenté l'ensemble des mécanismes immunitaires et non immunitaires de défense de la mamelle chez les ruminants. Les défenses immunitaires sont habituellement divisées en deux composantes : l'immunité innée et l'immunité adaptative.

L'immunité innée, aussi appelée spontanée ou non spécifique, permet de lutter contre les pathogènes par des mécanismes qui sont opérationnels dès le premier contact avec l'organisme. Les effecteurs de l'immunité non spécifique ne reconnaissent pas spécifiquement l'antigène et ne sont pas dotés de mémoire.

A l'inverse, l'immunité adaptative, aussi appelée acquise ou spécifique, nécessite un certain laps de temps avant d'être pleinement fonctionnelle. Ses effecteurs reconnaissent précisément les antigènes et leur efficacité est croissante au fur et à mesure des stimulations par ceux-ci grâce à un mécanisme de mémoire antigénique. La réponse immunitaire adaptative peut être décrite selon deux volets : la réponse à médiation cellulaire et la réponse à médiation humorale, la deuxième étant portée par les anticorps présents dans le lactosérum.

Notre étude s'intéresse aux brebis issues de la sélection divergente. Parce que le CCS est le critère de sélection, il existe une différence de réponse cellulaire entre les deux lignées en relation avec l'intensité de la réponse inflammatoire et elle a été montrée par ailleurs.

La question que nous posons maintenant est relative à une différence d'intensité ou de qualité de la production d'anticorps entre les deux lignées, c'est à dire une différence affectant le versant humoral de la réponse immunitaire. Autrement dit, la réponse anticorps développée par les deux lignées de brebis à la suite d'une immunisation avec un antigène est-elle différente ?

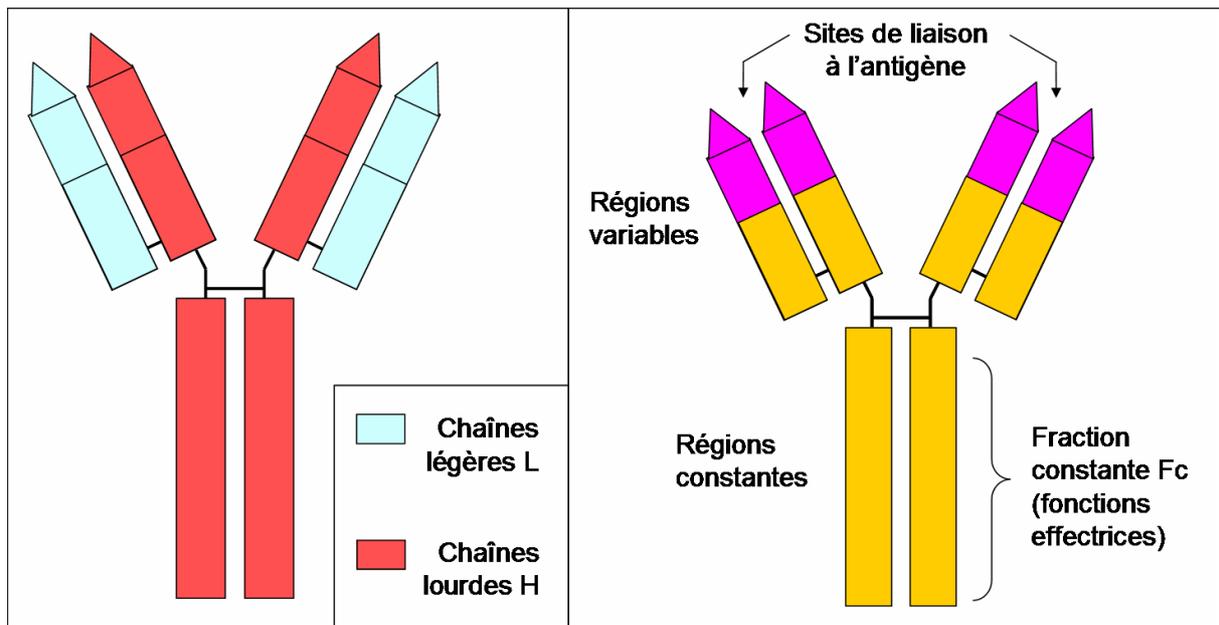
Avant de décrire le protocole expérimental, nous allons rappeler ce que sont les anticorps, comment ils sont produits, et quelles sont leurs actions possibles lors d'une infection bactérienne. Ces informations sont tirées de l'ouvrage de Janeway, Travers, Walport et Shlomchik (Janeway, 2003).

### 3. Les anticorps : définition, origine et fonctions

#### 3.1. Nature des anticorps

Les anticorps, appelés également immunoglobulines (Ig), sont des composés solubles du système immunitaire présents dans les liquides extracellulaires de l'organisme (certaines immunoglobulines sont cependant positionnées sur la membrane de certaines cellules immunitaires). Les anticorps ont la capacité, d'une part de reconnaître les antigènes dont ils sont spécifiques, d'autre part d'interagir avec d'autres molécules solubles et avec des récepteurs cellulaires, ce qui leur permet d'exercer de multiples fonctions.

L'anticorps est une glycoprotéine dont la structure est complexe. Il est composé de quatre parties identiques deux à deux : deux chaînes lourdes H (pour Heavy), et deux chaînes légères L (pour Light). Chaque chaîne protéique possède un fragment constant C et une partie variable V. L'assemblage se fait selon l'illustration présentée à la figure 5. Les régions V des chaînes H et L sont placées en vis-à-vis et constituent les deux sites de reconnaissance de l'antigène. Les régions C, elles aussi assemblées entre elles, forment la partie constante de l'anticorps appelée Fc, qui est responsable des autres fonctions de l'anticorps que nous détaillerons plus loin ; elle détermine aussi l'isotype de l'immunoglobuline.



**Figure 5 : Structure de l'anticorps**

Les immunoglobulines sont classées en plusieurs isotypes : immunoglobulines M (IgM), immunoglobulines G (IgG) dont il existe plusieurs sous-types, immunoglobulines A (IgA), immunoglobulines E (IgE). Les différents isotypes ont des fonctions différentes et sont diversement répartis dans l'organisme, comme l'illustre le tableau 2.

**Tableau 2 : Fonctions et répartition des différents isotypes d'immunoglobulines**

\* Les IgM se comportent en opsonines uniquement en présence du composé C3b du complément. (Adapté de Janeway, 2003, p361)

Activité fonctionnelle	IgM	IgG1	IgG2	IgA	IgE
Neutralisation	+	++	++	++	-
Opsonisation	++(*)	+	+++	-	-
Sensibilisation des mastocytes	-	-	-	-	+++
Activation du complément	+++	++	-	-	-
Répartition	IgM	IgG1	IgG2	IgA	IgE
Transport à travers l'épithélium	+	-	-	+++	-
Diffusion dans les sites extravasculaires	+/-	+++	+++	++	+

Les IgG et les IgA neutralisent les bactéries et leurs toxines en les empêchant d'interagir avec les cellules de l'organisme. Les IgG2 et les IgM agissent par opsonisation, seules ou en association avec le composé C3b du complément. Les IgM et les IgG1 peuvent activer la voie classique du complément.

Au sein d'un même isotype, les parties Fc des anticorps sont identiques ; à l'opposé, leurs régions V sont très différentes, ce qui permet la reconnaissance de nombreux antigènes, avec une affinité plus ou moins forte.

Les IgM sont les premières immunoglobulines produites au cours de la réponse humorale. Elles sont assemblées sous forme de pentamères ce qui leur donne un poids moléculaire élevé, les restreignant au compartiment sanguin. Comparée aux immunoglobulines produites plus tard au cours de la réponse, leur affinité pour l'antigène est faible mais l'organisation pentamérique augmente leur avidité et compense en partie cette différence. La localisation des IgM et la précocité de leur production leur confèrent un rôle essentiel dans la lutte contre les infections sanguines.

Les IgG, IgA et IgE sont produites dans un deuxième temps, et leur affinité pour l'antigène est bien plus élevée.

Les IgG représentent l'isotype le plus abondant dans le sang et les fluides extracellulaires. Comme ces anticorps diffusent facilement dans l'organisme, ils sont principalement impliqués dans la protection des tissus.

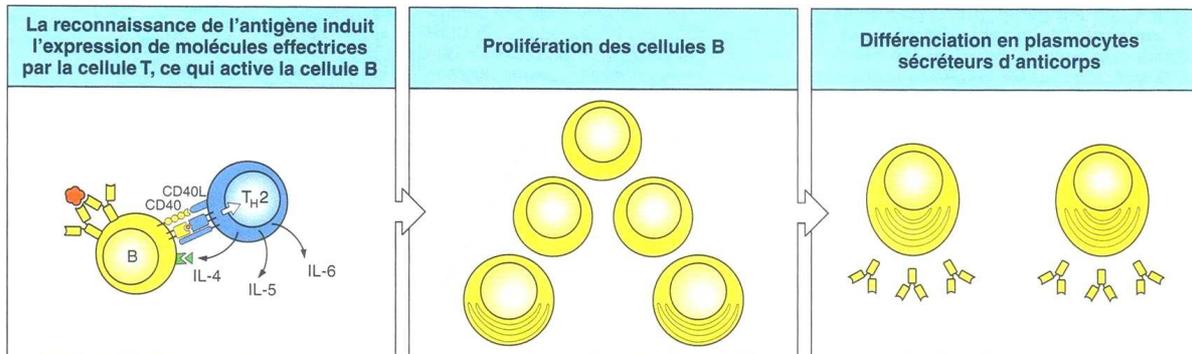
Les IgA sont assemblées sous forme de dimères et sont produites aux interfaces digestive, respiratoire, génitale et mammaire dans certaines espèces, où elles sont excrétées au travers des épithéliums par transcytose. Elles protègent les muqueuses de l'organisme.

Les IgE sont disposées à la surface de leucocytes localisés sous la peau et les muqueuses, ainsi que le long des vaisseaux sanguins. Elles permettent surtout le déclenchement de réactions de défense locales, susceptibles d'éliminer l'agent infectieux.

Les anticorps ayant été présentés, nous allons maintenant décrire leur origine. La production des anticorps est le résultat d'un processus complexe faisant intervenir différentes populations cellulaires et de nombreux médiateurs cytokiniques.

## 3.2. Origine des anticorps

Les grandes étapes aboutissant à la production des anticorps sont représentées à la figure 6.



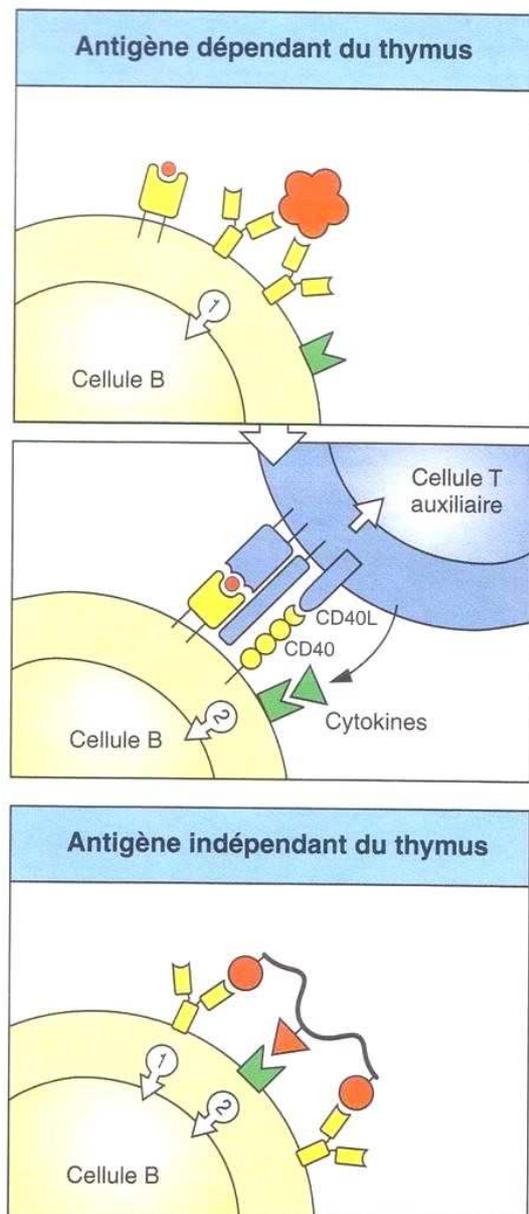
**Figure 6 : Déclenchement de la production des anticorps**

Les cellules T auxiliaires armées stimulent la prolifération et la différenciation des lymphocytes B ayant reconnu l'antigène. (D'après Janeway, 2003, p346)

### 3.2.1. Activation du lymphocyte B

Lorsqu'un antigène interagit avec le récepteur membranaire d'un lymphocyte B (appelé aussi immunoglobuline de surface ou sig), on parle de reconnaissance de l'antigène par la cellule B. La particule portant l'antigène, par exemple une bactérie, est alors internalisée et dégradée par le lymphocyte. Ensuite, les peptides issus de la dégradation sont présentés à la surface de la membrane plasmique, liés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). Il suffit alors que cette association antigène-CMH II soit reconnue par le récepteur membranaire de l'antigène ou TCR (pour T cell receptor), en association avec le corécepteur CD4 d'un lymphocyte T auxiliaire, pour que le lymphocyte B soit activé. En effet, la cellule T produit plusieurs signaux, d'une part au moyen de molécules membranaires comme le CD40 ligand qui interagit avec le CD40 de la cellule B, d'autre part au moyen de cytokines comme l'interleukine 4 (Figure 7). Ces signaux aboutissent à l'entrée du lymphocyte B dans une phase de multiplication rapide que l'on désigne comme l'activation du lymphocyte B. L'expansion clonale qui en découle se déroule au sein d'une formation lymphoïde, par exemple un nœud lymphatique ou la rate.

Selon le mécanisme que nous venons de décrire, l'activation des cellules B nécessite à la fois la reconnaissance de l'antigène et l'intervention des lymphocytes T. Les antigènes associés à ce mécanisme d'activation sont appelés antigènes dépendants du thymus ou T-dépendants. Il est à noter que certains antigènes ont la capacité d'activer seuls les lymphocytes B, sans intervention des cellules T. On parle alors d'antigènes indépendants du thymus. La suite de notre exposé ne concerne que les antigènes T-dépendants car l'ovalbumine, l'antigène modèle que nous avons utilisé dans notre protocole, appartient à cette catégorie.



**Figure 7 : Activation des lymphocytes B**

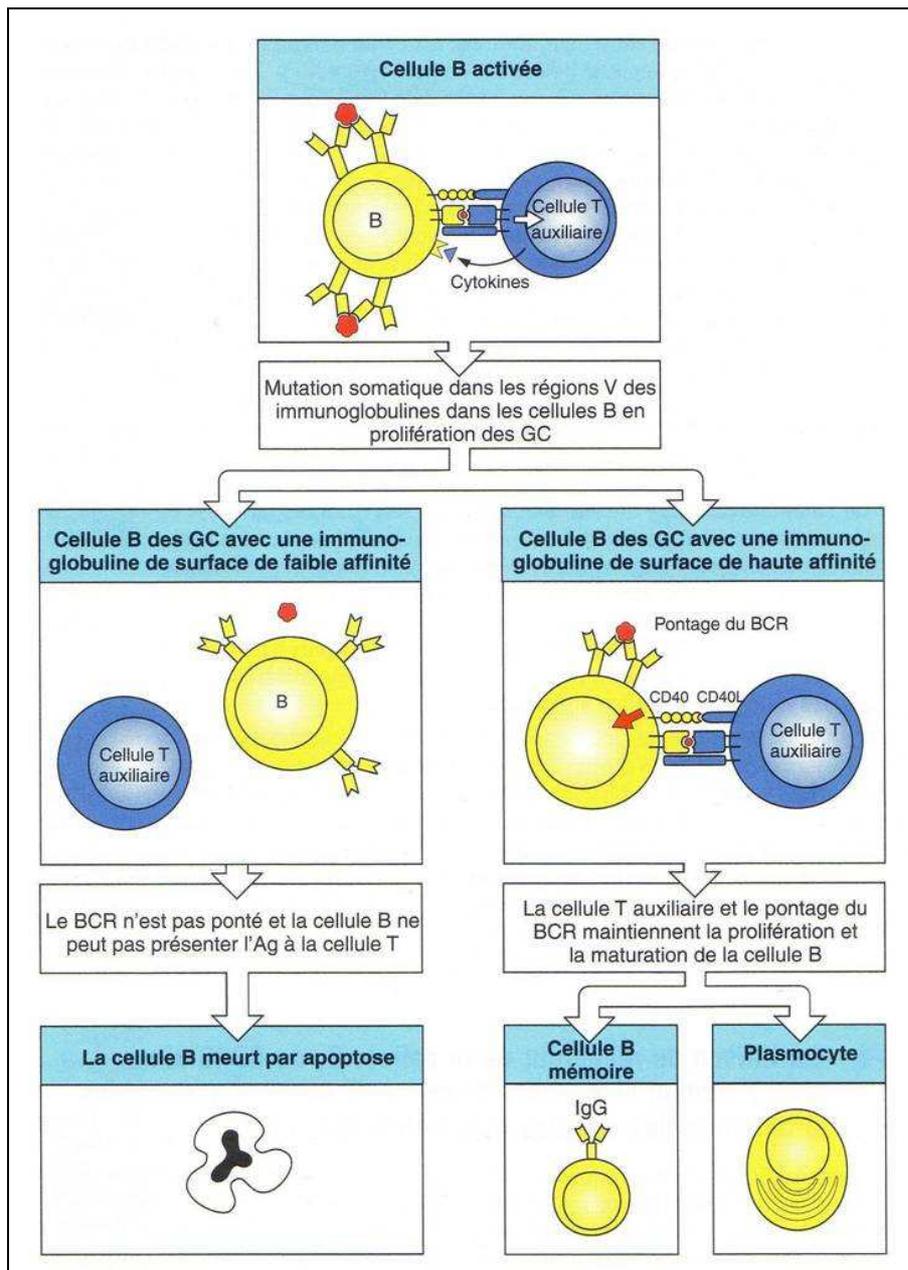
L'activation des cellules B par les antigènes dépendant du thymus ou indépendant du thymus requiert un second signal. (D'après Janeway, 2003, p343)

Pendant que les cellules issues de l'expansion clonale produisent une première vague d'anticorps (IgM), certains lymphocytes B ont un devenir particulier qui se déroule dans une zone précise de la formation lymphoïde appelée centre germinatif. Deux évènements principaux s'y déroulent : la sélection de lymphocytes B à affinité augmentée pour l'antigène et la commutation de classe. En parallèle, les cellules continuent à se multiplier ce qui entraîne une forte amplification de la réponse humorale.

### 3.2.2. Sélection de lymphocytes B de meilleure affinité pour l'antigène

Les cellules B du centre germinatif subissent un phénomène d'hypermutation somatique localisé aux gènes codant pour la région variable des immunoglobulines. A la suite des nombreuses mutations génétiques qui en découlent, environ un

lymphocyte B sur deux présente une modification du récepteur de surface. Dans la majorité des cas, les mutations ont un effet négatif sur la capacité du lymphocyte à se fixer à l'antigène d'origine, et la cellule est éliminée par apoptose. A l'inverse, les cellules dont l'affinité pour l'antigène est augmentée sont sélectionnées et entrent dans un nouveau cycle de division (Figure 8). Grâce à cette sélection positive, l'organisme est progressivement rendu capable de fournir une réponse humorale de plus en plus performante.



**Figure 8 : Sélection de lymphocytes B de plus grande affinité pour l'antigène**

(D'après Janeway, 2003, p353)

### 3.2.3. Commutation de classe

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe différentes classes d'anticorps appelées isotypes, dont les fonctions sont diverses. Lors de la réponse humorale, ce sont les IgM qui sont produites en premier. Par la suite, l'expression des gènes codant pour la région C des chaînes lourdes est modifiée en fonction des cytokines produites par les lymphocytes T auxiliaires. Les lymphocytes B produisent alors une classe d'anticorps adaptée à l'agent pathogène qui a provoqué la réponse humorale. C'est ce que l'on appelle la commutation de classe. Les rôles respectifs des différentes cytokines dans la commutation de classe ne sont pas encore élucidés ; cependant certaines cytokines sont connues pour jouer un rôle majeur (Tableau 3).

**Tableau 3 : Rôle des cytokines dans l'expression des isotypes d'immunoglobulines**

(Estes, 1996 ; Estes, 2002)

Cytokines	IgM	IgG1	IgG2	IgA	IgE
IL-2	Induit	Augmente	Augmente		Augmente
IFN $\gamma$		Inhibe	Induit		Inhibe
IL-4 / IL13		Induit			Induit
TGF $\beta$ (+ IL-2 + IL-10)	Inhibe			Induit	

### 3.2.4. Différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et lymphocytes B mémoires

A la suite des étapes d'hypermutation/sélection et de commutation de classe, le centre germinatif contient des lymphocytes B capables de produire des immunoglobulines de haute affinité et dont l'isotype est adapté à l'agent pathogène. La différenciation de ces cellules aboutit à deux types de cellules spécialisées : les lymphocytes B mémoires et les plasmocytes.

Les lymphocytes B mémoires produisent peu d'anticorps et persistent longtemps dans l'organisme ; ces cellules sont prêtes à déclencher une nouvelle réponse humorale rapide et de grande efficacité en cas de nouveau contact avec l'antigène.

Avant de se différencier en plasmocytes, les cellules B passent par le stade de plasmoblaste, une étape intermédiaire de spécialisation cellulaire. Seuls les plasmoblastes continuent à se diviser. Les plasmocytes vont se localiser dans la moelle osseuse et forment une source d'anticorps de haute affinité pendant de grandes périodes de temps.

### 3.3. Fonctions des anticorps

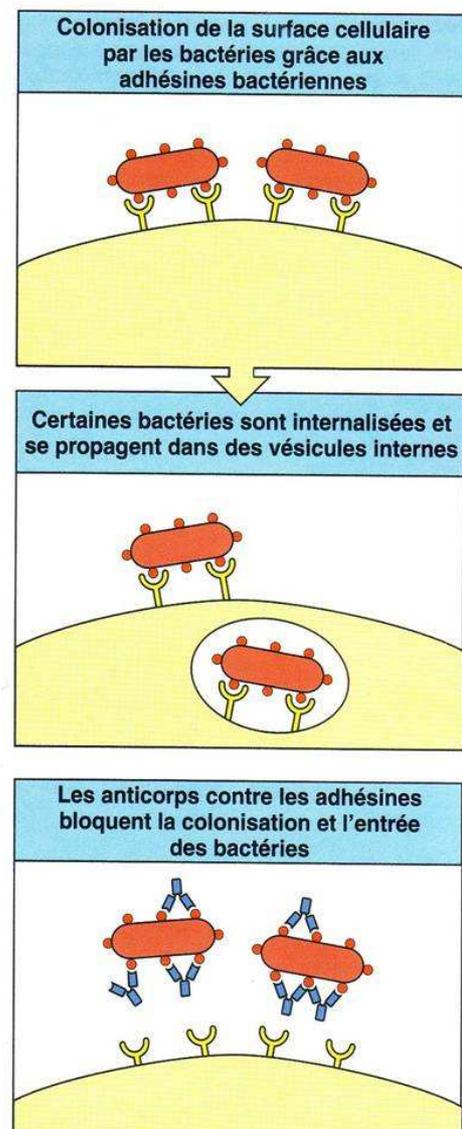
Les anticorps une fois produits sont libérés dans le milieu extracellulaire où ils exercent leurs fonctions de lutte contre l'agent pathogène. Cette lutte est possible par trois modes d'action principaux : la neutralisation, l'opsonisation et l'activation du complément.

#### 3.3.1. Neutralisation

De nombreuses bactéries exercent leur effet pathogène en pénétrant à l'intérieur des cellules ou en se fixant à leur surface. L'attachement à la membrane de la cellule se fait alors par le biais de molécules de surface appelées adhésines. Les anticorps qui se fixent aux adhésines peuvent empêcher l'adhérence des bactéries aux cellules (Figure 9). On parle alors de neutralisation des bactéries.

**Figure 9 : Neutralisation des bactéries**

Les anticorps peuvent empêcher la fixation des bactéries à la surface de la cellule. (D'après Janeway, 2003, p366)



Ce mécanisme d'action concerne la plupart des isotypes, et notamment les IgG et les IgA. Ainsi, la glande mammaire en lactation bénéficie de la protection conférée par les IgA produites dans la muqueuse, principalement chez les espèces monogastriques.

Il est à noter que les mêmes anticorps peuvent aussi neutraliser les toxines bactériennes en empêchant leur liaison aux récepteurs exprimés par les cellules.

La neutralisation permet de lutter contre une partie seulement des bactéries. De plus, une fois neutralisés, les agents pathogènes doivent être éliminés de l'organisme. L'opsonisation et l'activation du complément complètent la fonction de neutralisation en permettant la destruction et l'élimination des bactéries.

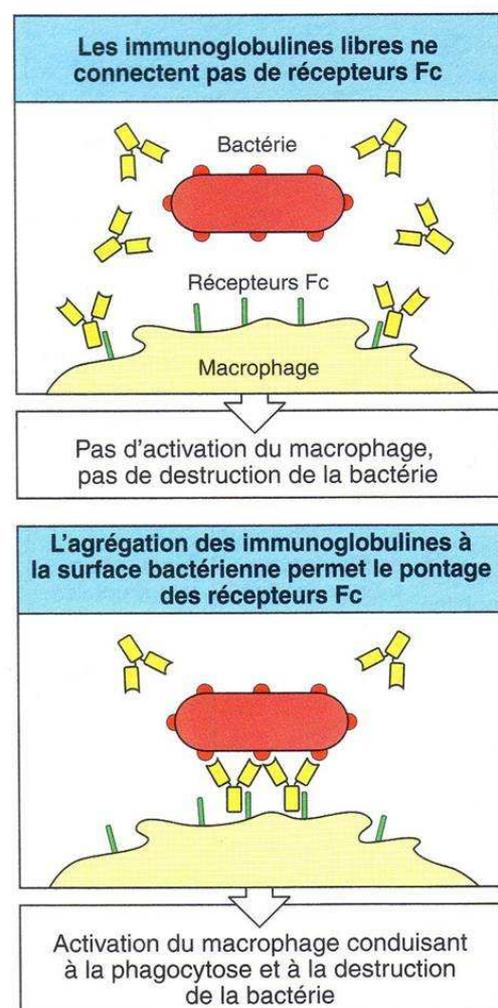
### 3.3.2. Opsonisation

On parle d'opsonisation lorsqu'un antigène particulaire (une bactérie par exemple) est recouvert de molécules solubles appelées opsonines qui facilitent l'action des cellules phagocytaires. Ce mode d'action concerne les IgM et les IgG2.

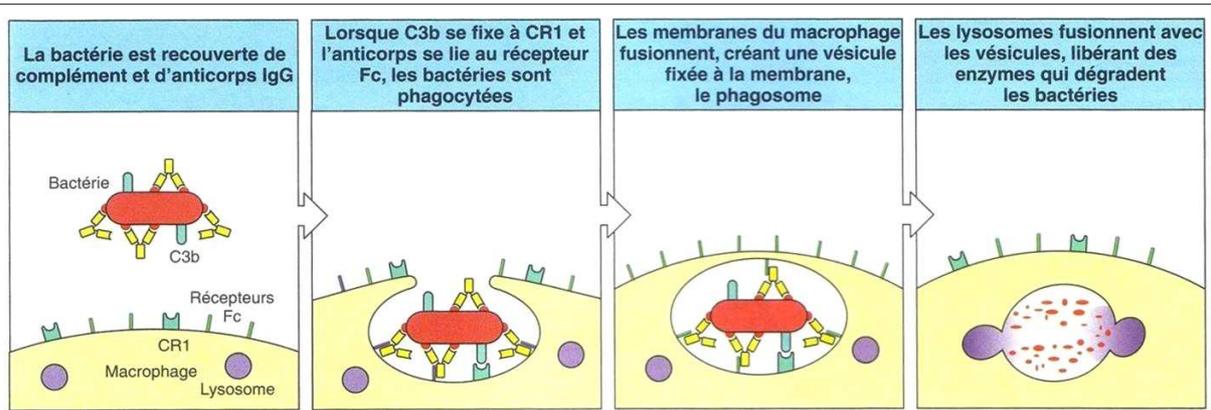
Une fois que les anticorps sont fixés à l'antigène, leur partie Fc est reconnue par les récepteurs au fragment Fc des cellules phagocytaires (Figure 10), principalement les polynucléaires neutrophiles et les cellules de la lignée monocytaire (dont les macrophages). L'interaction moléculaire facilite l'internalisation de l'antigène par le phagocyte et stimule la lyse de la particule phagocytée (Figure 11).

**Figure 10 : Opsonisation d'une bactérie**

Les anticorps fixés à la surface de la bactérie permettent la phagocytose et l'activation des cellules phagocytaires. (D'après Janeway, 2003, p372)



Les anticorps ne sont pas les seules molécules à pouvoir jouer le rôle d'opsonines, c'est aussi le cas du fragment C3b du complément qui agit en synergie avec les anticorps.

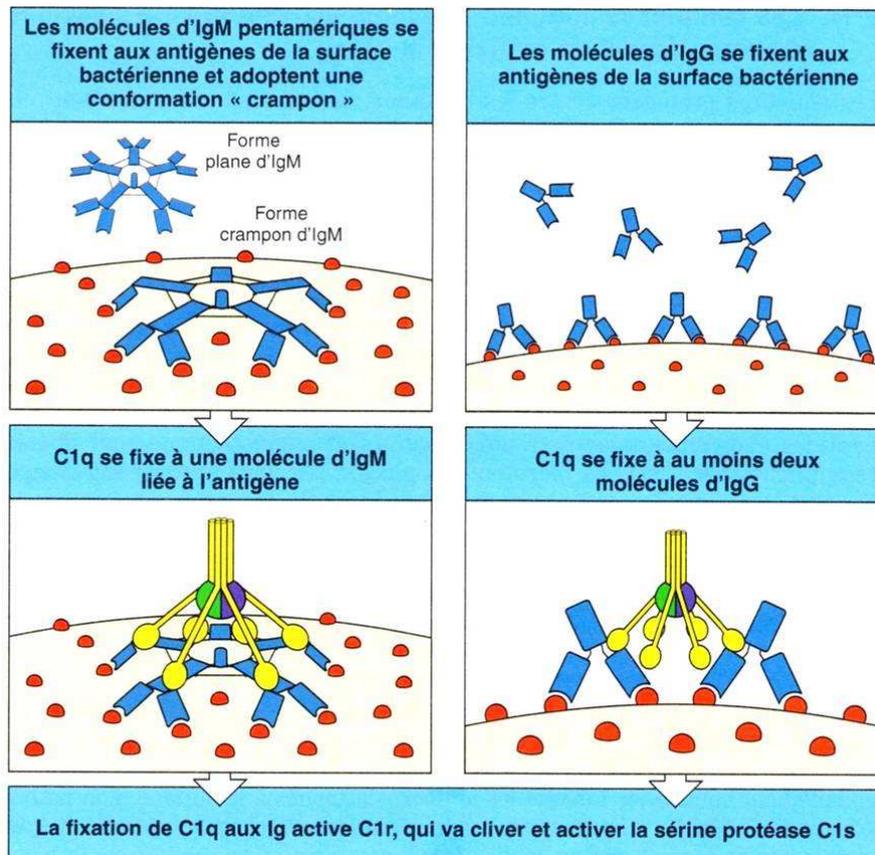


**Figure 11 : Rôle des opsonines**

Les récepteurs Fc et les récepteurs du complément des phagocytes induisent la capture et la dégradation des bactéries couvertes d'anticorps. (D'après Janeway, 2003, p373)

### 3.3.3. Activation du complément

Les anticorps n'agissent pas seulement en synergie avec le complément ; ils en déclenchent la voie classique d'activation.



**Figure 12 : Activation de la voie classique du complément par les IgM et les IgG**

(D'après Janeway, 2003, p368)

Le composé C1q du complément reconnaît les parties Fc des IgM et des IgG1 liés à l'antigène et cela entraîne son activation (Figure 12). L'activation du composé C1q provoque celle du complément par ce que l'on appelle la voie classique.

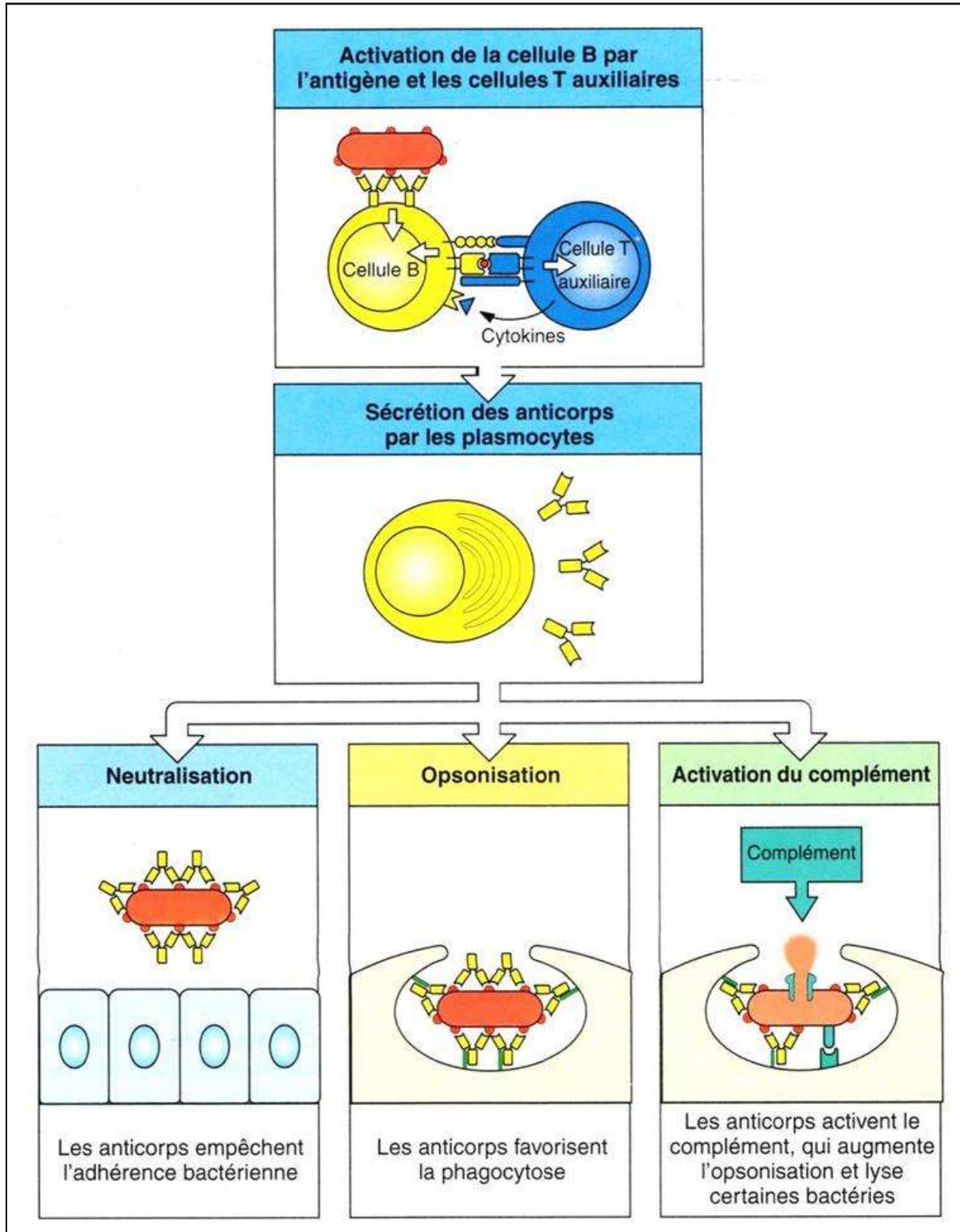
Comme nous l'avons vu plus haut, le complément fonctionne comme une cascade de réactions enzymatiques déclenchée par le contact de l'organisme avec un antigène, et qui aboutit toujours aux mêmes fonctions effectrices : le fragment C3b, un composant intermédiaire libéré dans le sérum, joue le rôle d'opsonine ; le fragment C5a, qui est lui aussi libéré au cours de la cascade, exerce des activités inflammatoires et chimiotactiques permettant le recrutement des phagocytes ; enfin, l'étape terminale est la formation du complexe d'attaque membranaire qui peut détruire les bactéries possédant une paroi.

### 3.4. Conclusion

En conclusion à ces rappels sur les anticorps, la figure 13 présentée ci-contre résume le déclenchement et le fonctionnement de la réponse immunitaire humorale.

Nous allons maintenant décrire le protocole expérimental que nous avons utilisé. Comme nous l'avons dit plus haut, l'objectif de notre étude est de déterminer s'il y a une différence de réponse humorale entre les brebis des lignées CCS+ et CCS-.

L'approche que nous avons retenue pour la comparaison entre les lignées est l'immunisation avec un antigène modèle vis-à-vis duquel les animaux sont *a priori* naïfs. Nous comparons ensuite les réponses humorales entre brebis par dosage des IgG car c'est l'isotype le plus abondant et le plus pertinent chez les ruminants laitiers.



**Figure 13 : Déroulement de la réponse immunitaire humorale**

L'activation des lymphocytes B entraîne leur différenciation en plasmocytes et la production d'anticorps qui limitent le développement bactérien par la neutralisation, l'opsonisation et l'activation du complément. (D'après Janeway, 2003, p342)

# MATERIELS ET METHODES

## 1. Animaux

L'expérimentation porte sur 42 brebis laitières de race Lacaune appartenant au troupeau de l'unité expérimentale INRA de La Fage (Unité Expérimentale 321, Roquefort, France). Ces brebis, qui ont terminé leur deuxième lactation, sont réparties en deux groupes correspondant aux deux lignées de la sélection génétique. Les effectifs sont à peu près équilibrés, puisque le groupe CCS- comporte 22 brebis et le groupe CCS+ 20 brebis. Les animaux sont élevés en un seul lot pour éviter tout biais environnemental.

La mise à la reproduction est opérée début juillet 2006, la mise bas sur insémination artificielle (IA) étant prévue la semaine du 27 novembre 2006. Les femelles présentant un retour en chaleur sont placées en présence d'un bélier. Les dates de mise bas sont indiquées en annexe 2. Après une période d'allaitement de 33 jours en moyenne (29 à 44 jours), les agneaux sont retirés et les brebis sont traitées deux fois par jour.

Le calendrier expérimental comporte trois étapes : l'immunisation, la stimulation intra-mammaire et la stimulation systémique en phase mémoire. Il est détaillé en annexe 1 et représenté schématiquement par la figure 14.

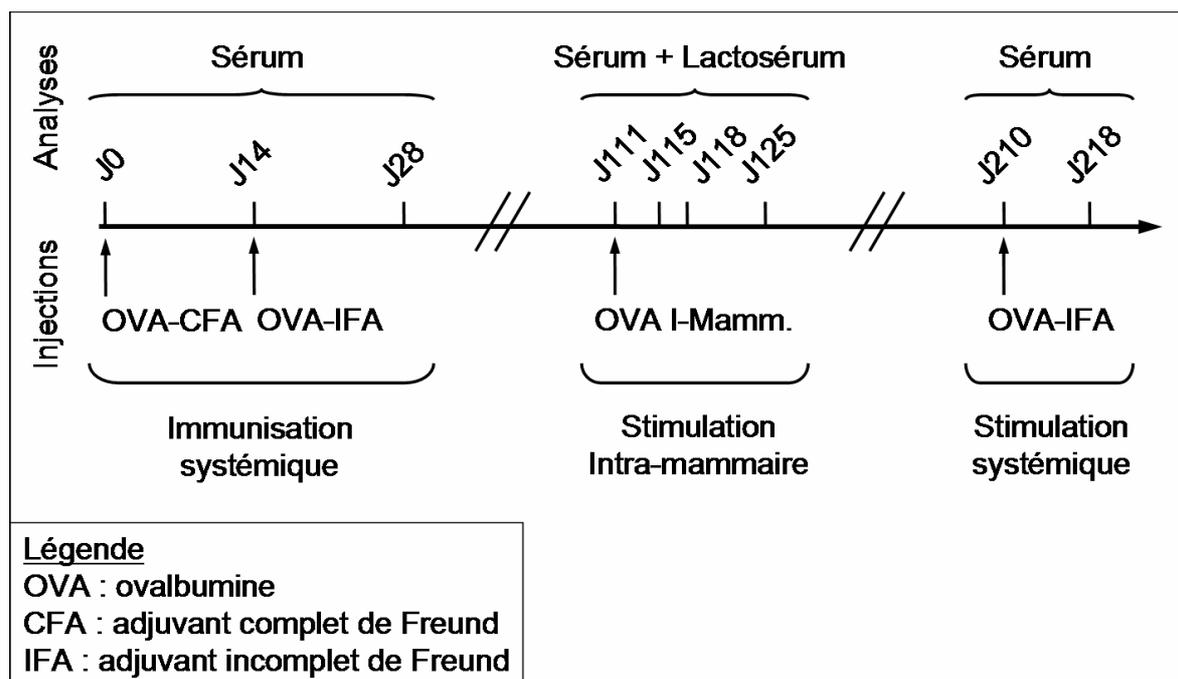


Figure 14 : Calendrier expérimental

## 2. Immunisation

Pour étudier la réponse immunitaire humorale, nous avons choisi d'utiliser un antigène modèle avec lequel les brebis n'ont jamais été en contact avant le début de l'expérimentation. L'antigène en question est un antigène inerte : l'albumine du blanc d'œuf de poule ou ovalbumine. L'immunisation est réalisée à l'aide de deux injections intradermiques d'une émulsion d'ovalbumine dans de l'adjuvant de Freund complet d'abord, puis incomplet au moment du rappel. Les deux injections sont réalisées à 14 jours d'intervalle, respectivement en arrière de la pointe du coude droit et du coude gauche.

En parallèle, on procède à des prises de sang sur tube sec stérile le jour de la première immunisation (J0), puis 14 et 28 jours après, dans le but de mesurer les titres d'anticorps sériques anti-ovalbumine.

*Injectât : solution antigénique 50%, adjuvant 50%. Volume total 500 µl, mélange de 500 µg d'ovalbumine (SIGMA, réf A5503) diluée dans 250 µl de PBS stérile apyrogène (INVITROGEN) avec 250 µl d'adjuvant de Freund (SIGMA), complet à J0, incomplet à J14. Une seule préparation pour tous les animaux.*

Le stade de gestation d'une brebis au moment de l'immunisation est représenté par le nombre de jours de gestation. Celui-ci est calculé d'après la date de mise bas, en se basant sur une durée de gestation type de 150 jours. Les valeurs sont indiquées en annexe 2.

## 3. Stimulation intra-mammaire

A J111 (1/02/07), on injecte de l'ovalbumine (50 µg d'ovalbumine diluée dans 200 µl de PBS stérile apyrogène) dans le trayon de l'hémi-mamelle droite aux brebis ayant mis bas sur insémination artificielle (mises bas du 26/11/06 au 4/12/06). Les brebis ayant agnelé plus tardivement sont écartées de cette phase de l'étude pour des raisons pratiques ; il reste alors 13 brebis dans le groupe CCS- et 11 dans le groupe CCS+.

Des prélèvements de lait issu de l'hémi-mamelle droite sont réalisés à J111, J115, J118 et J125 (soit respectivement 0, 4, 7 et 14 jours après le rappel) dans des tubes de 5 ml afin de mesurer les titres en anticorps anti-ovalbumine présents dans le lait.

Le dosage des anticorps est réalisé à partir de la phase protéique du lait obtenue après centrifugation (ce qui permet l'élimination des cellules et d'une grande partie de la matière grasse du lait). On procède aussi aux mêmes dates à des prises de sang sur tube sec pour doser les anticorps sériques.

#### 4. Stimulation systémique en phase mémoire

Un rappel antigénique en adjuvant incomplet de Freund (cf. supra pour l'injectât) est réalisé à J210 pour évaluer la réponse mémoire. Des prises de sang sont faites à J210 et J218 pour le dosage des IgG sériques.

#### 5. Dosage des anticorps spécifiques dans le sérum

##### 5.1. Obtention du sérum

Immédiatement après prélèvement, les tubes de sang sont placés dans une étuve à 37°C pendant 30 minutes, puis centrifugés à 2500 tours/minute pendant 5 à 7 minutes. Le sérum est ensuite prélevé et placé dans des tubes secs. Ces derniers sont identifiés et stockés au congélateur en position verticale.

##### 5.2. ELISA

La quantité d'immunoglobulines G anti-ovalbumine est mesurée au moyen d'un ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) qui a été développé spécifiquement pour ce travail. Cette méthode se déroule en plusieurs étapes, détaillées en annexe 3. L'antigène est tout d'abord fixé à la plaque ELISA. Le sérum est ensuite introduit ce qui permet la fixation des anticorps spécifiques par la réaction antigène-anticorps, les anticorps du sérum étant appelés anticorps primaires. Dans un deuxième temps on ajoute des anticorps anti-IgG de mouton ; ces anticorps, appelés anticorps secondaires, sont marqués avec une enzyme, la peroxydase. On obtient donc des complexes antigène-anticorps primaire-anticorps secondaire. La quantité de ces complexes est mesurée grâce à une réaction chimique catalysée par

l'enzyme fixée à l'anticorps secondaire. Cette réaction enzymatique aboutit à la modification de couleur d'un substrat coloré. La concentration en anticorps du sérum est donc reliée à la densité optique obtenue après un temps de réaction donné. La densité optique est mesurée par un spectrophotomètre d'absorbance.

Dans le but d'augmenter la fiabilité des déterminations, les mesures sont réalisées en double et à plusieurs dilutions différentes de l'échantillon, quatre le plus souvent ; cela permet d'optimiser la précision de la mesure. En outre, chaque plaque ELISA comporte un témoin négatif et un standard servant de référence. Ces précautions permettent de maîtriser les biais analytiques au maximum.

## 6. Dosage des anticorps présents dans le lait

### 6.1. Obtention du lactosérum

Le lait entier est conservé sous forme congelée à -20°C. Après décongélation, les échantillons conditionnés en tube sec de 5 ml sont centrifugés à 1200g pendant 20 minutes, à la température de 4°C. Le surnageant, constitué de la graisse, est retiré. Le lactosérum est ensuite prélevé et stocké au congélateur en tube Eppendorf de 2 ml de volume.

### 6.2. ELISA

Les taux d'anticorps contenus dans le lait sont eux aussi mesurés au moyen de la méthode ELISA.

## 7. Analyse statistique

Le caractère analysé est le titre en anticorps aux différentes dates de mesure : pendant l'immunisation (J0, J14, J28), après le rappel intra-mammaire (J111, J115, J118, J125), et après le rappel systémique (J210, J218). Les données brutes ne respectant pas une distribution normale, une transformation logarithmique en base

deux est utilisée. Compte tenu du faible nombre de points de mesures et de l'évolution non linéaire du titre en anticorps, les résultats sont analysés à l'aide d'un modèle linéaire à chaque date, à l'aide du logiciel SAS. En fonction de la phase de l'étude, trois modèles statistiques différents sont utilisés.

### 7.1. Modèle statistique en phase d'immunisation

L'équation du modèle est la suivante, où la variable dépendante Y est telle que :

$$Y = \mu + \beta_1 C + \beta_2 G + e$$

Avec -  $\mu$ , la moyenne exprimée en logarithme (log) de base 2 de la valeur du titre en anticorps mesuré

- C, le groupe génétique CCS (2 groupes, + et -)
- G, le stade de gestation (3 classes, 0, <90j et >90j, cf. plus loin)
- e, l'erreur inter-animaux
- $\beta_1$  et  $\beta_2$ , les paramètres de régression associés aux variables explicatives C et G.

Le nombre de mesures est de 42 à chaque point (J0, J14 et J28). Compte tenu des faibles effectifs, l'interaction entre la lignée CCS et le stade de gestation n'est pas évaluée. Vis-à-vis de la gestation, l'effectif est réparti en trois classes selon le statut à J0 : brebis non gestantes (codées 0), brebis à moins de 90 jours de gestation, et brebis à plus de 90 jours de gestation.

### 7.2. Modèle statistique après stimulation intra-mammaire

L'équation du modèle est la suivante, où la variable dépendante Y est telle que :

$$Y = \mu + \beta_1 C + \beta_2 V_{28} + e$$

Avec -  $\mu$ , la moyenne exprimée en log de base 2 de la valeur du titre en anticorps mesuré dans sérum ou le lait

- C, le groupe génétique CCS (2 groupes, + et -)
- $V_{28}$ , la différence par rapport à la moyenne des titres en anticorps à J28 (log de base 2)

- e, l'erreur inter-animaux
- $\beta_1$  et  $\beta_2$ , les paramètres de régression associés aux variables explicatives C et V<sub>28</sub>.

L'effet du stade de gestation n'est pas testé car pour la stimulation intra-mammaire on n'a conservé que les brebis ayant mis bas sur insémination artificielle. Le nombre de mesures est de 24 à chaque point (J111, J115, J118 et J125).

### 7.3. Modèle statistique après stimulation systémique en phase mémoire

L'équation du modèle est la suivante, où la variable dépendante Y est telle que :

$$Y = \mu + \beta_1 C + \beta_2 G + \beta_3 E + e$$

Avec -  $\mu$ , la moyenne exprimée en log de base 2 de la valeur du titre en anticorps mesuré

- C, le groupe génétique CCS (2 groupes, + et -)
- G, le stade de gestation (3 classes, 0, <90j et >90j)
- E, le fait d'avoir subi ou non un challenge intra-mammaire (2 groupes, OUI et NON)
- e, l'erreur inter-animaux
- $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$ , les paramètres de régression associés aux variables explicatives C, G et E.

Le nombre de mesures est de 34 à J210 et de 33 à J218.

Pour chaque période, l'évolution des titres en anticorps entre les différents points de mesure est aussi analysée par des modèles linéaires similaires, où cette fois la variable dépendante Y est la différence de titre en anticorps entre 2 dates. Les variables explicatives testées sont les même.

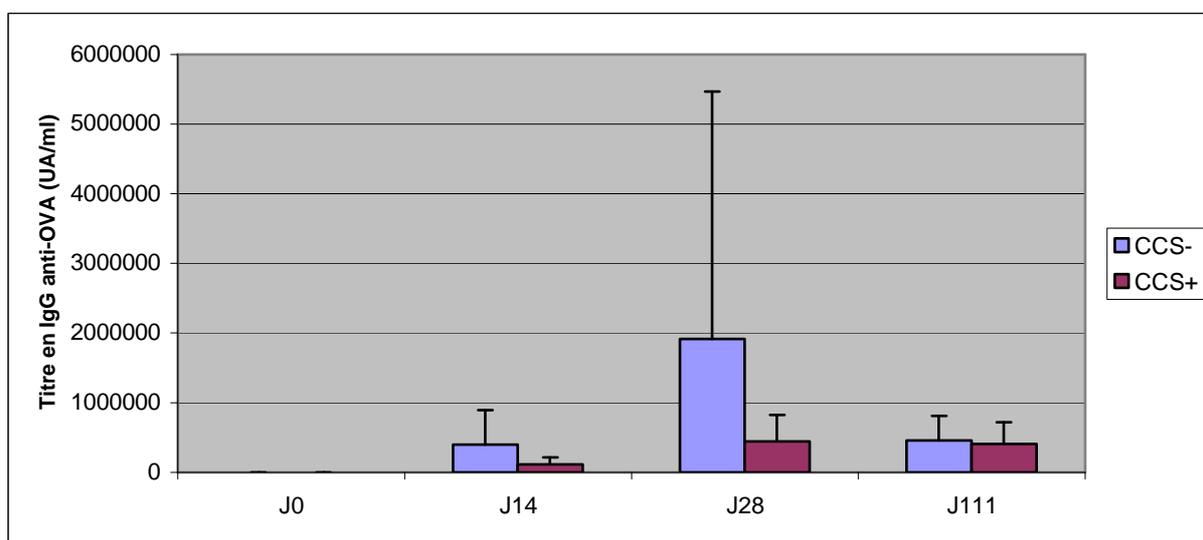
# RESULTATS

Les valeurs obtenues à l'issue des dosages ELISA sont présentées en annexe 4, avant et après transformation logarithmique, dans les tableaux 7 à 9.

## 1. Réponse anticorps pendant et après immunisation

### 1.1. Intensité de la réponse anticorps en phase d'immunisation

Les figures 15 et 16 comparent l'évolution des taux d'anticorps au cours de l'immunisation dans les groupes CCS+ et CCS-.

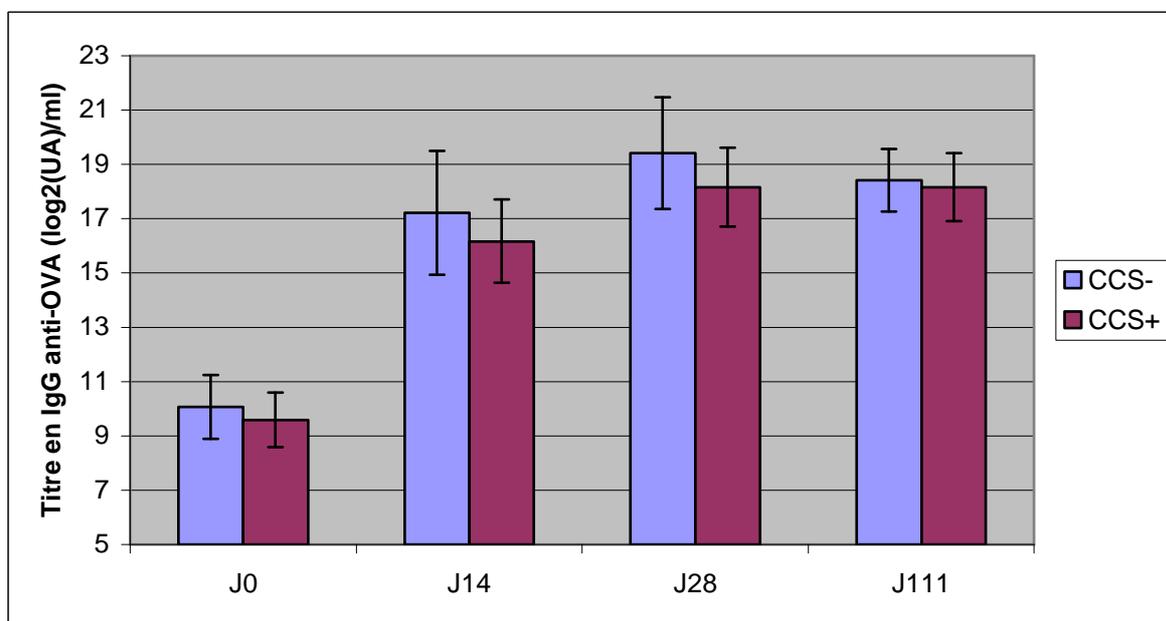


**Figure 15 : Evolution de la quantité d'anticorps spécifiques au cours de l'immunisation**

A J0, le taux moyen d'anticorps est à la limite du seuil de détection avec l'ELISA tel qu'il a été développé. Ces valeurs sont donc négligeables par rapport aux valeurs ultérieures ce qui confirme l'absence d'anticorps ou la présence de taux extrêmement faibles d'anticorps réagissant avec l'ovalbumine chez les animaux de l'essai.

Par la suite les valeurs augmentent successivement à J14 et J28. L'écart type est très grand à cette dernière date. A J111, le taux moyen d'anticorps du groupe CCS+ reste comparable à celui mesuré à J28, celui du groupe CCS- semble diminuer pour avoisiner celui mesuré à J14.

Excepté à J0 où l'on n'observe pas de différence entre les groupes, le taux moyen d'anticorps du groupe CCS- est supérieur à celui du groupe CCS+ à toutes les dates où il a été mesuré. La différence apparente est maximale à J28, elle est par contre très faible à J111.



**Figure 16 : Quantités d'anticorps produites au cours de l'immunisation, après transformation logarithmique**

Après transformation logarithmique des valeurs, on retrouve une même évolution générale. Les moyennes augmentent de J0 à J28, puis à J111 on observe une stabilisation pour le groupe CCS+ et une légère diminution pour le groupe CCS-.

Quelle que soit la date choisie, le taux moyen d'anticorps des brebis CCS- est supérieur à celui des brebis CCS+.

Dans le but d'observer plus finement les différences de réponses anticorps entre brebis CCS+ et CCS-, les trois graphiques suivants représentent les valeurs individuelles à J14, J28 et J111.

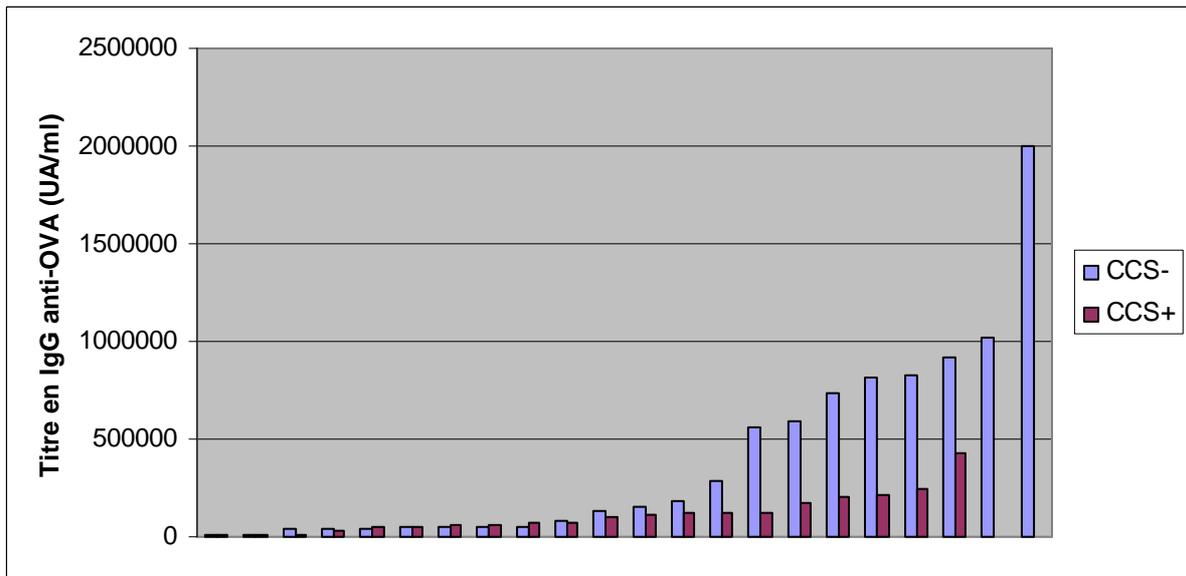


Figure 17 : Distribution des quantités d'anticorps mesurées à J14

A J14, environ deux tiers des brebis CCS- présentent des quantités d'IgG comparables aux brebis CCS+ et inférieures à  $500 \cdot 10^3$  unités/ml. Pour le troisième tiers des brebis CCS-, c'est-à-dire 8 d'entre elles, les valeurs sont nettement plus grandes, en particulier une brebis dont le taux d'IgG avoisine  $2000 \cdot 10^3$  unités/ml.

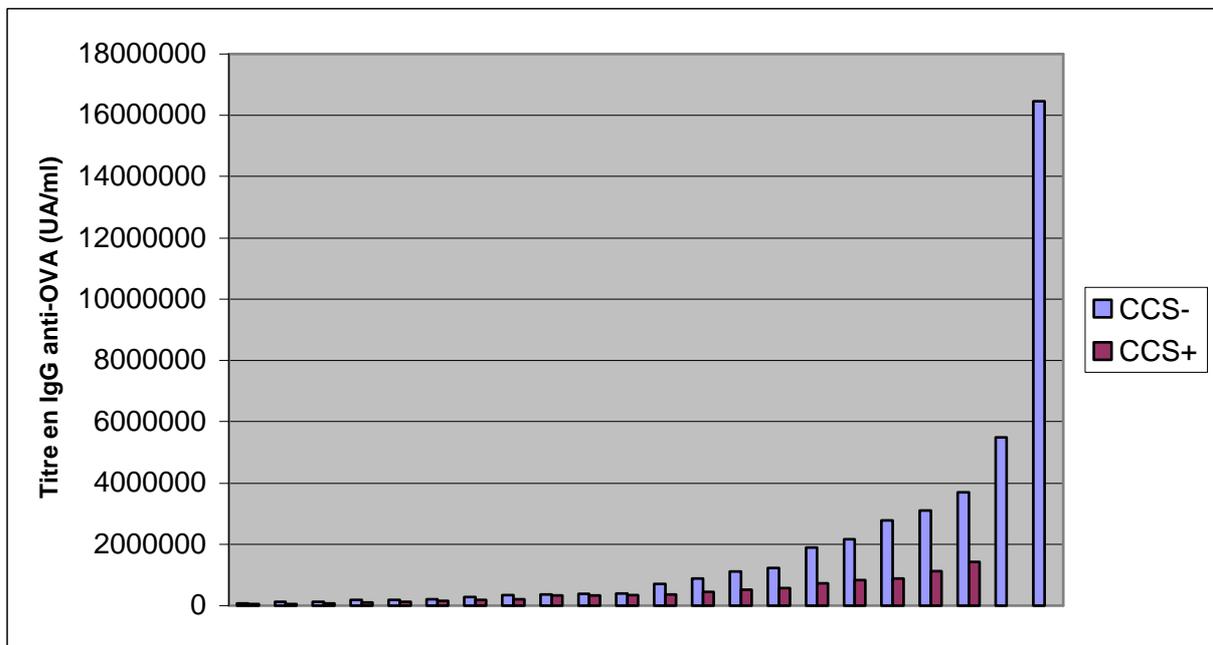


Figure 18 : Distribution des quantités d'anticorps mesurées à J28

A J28, on retrouve une distribution qui ressemble à celle enregistrée à J14. Les valeurs mesurées d'anticorps sont toujours inférieures à  $15 \cdot 10^5$  UA/ml pour les brebis

CCS+ alors que 7 brebis du groupe CCS- ont des valeurs supérieures. A nouveau, une des brebis CCS- (pas la même cependant) présente un taux d'anticorps très élevé, supérieur à  $16.10^6$  UA/ml.

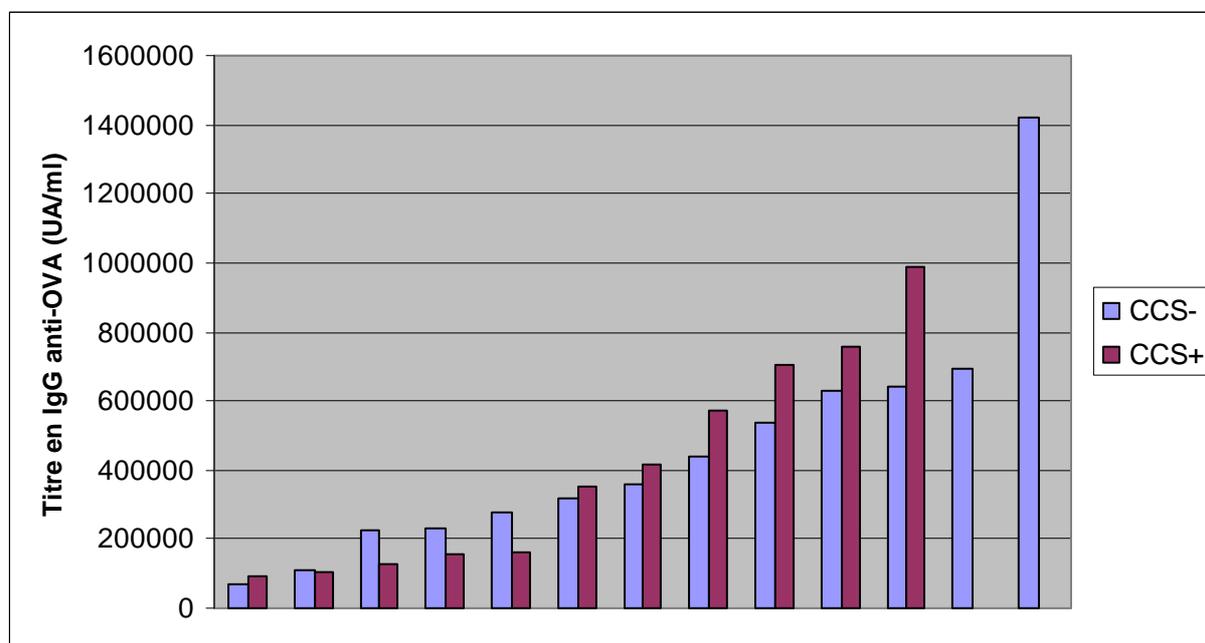


Figure 19 : Distribution des quantités d'anticorps mesurées à J111

A J111, le nombre d'échantillons analysés est plus faible car seules les brebis ayant subi un challenge intra-mammaire sont prises en compte. Cela se traduit par le retrait de 9 brebis du groupe CCS- et de 9 brebis du groupe CCS+. A cette date, la distribution des valeurs ne montre pas de différence évidente entre les deux lignées, cependant il faut noter que parmi les 9 brebis CCS- retirées de l'étude, 7 présentaient de fortes réponses anticorps à J14 et J28.

## 1.2. Variation de la réponse anticorps en fonction du stade de gestation

En considérant que la durée de la gestation chez la brebis est de 150 jours, la date de mise bas a permis de calculer le nombre de jours de gestation au moment de la première injection d'ovalbumine.

Lorsqu'on représente la réponse anticorps à J14 et J28 en fonction du stade de gestation lors de l'immunisation, on constate une diminution de l'intensité de la

réponse anticorps d'autant plus marquée que la gestation est avancée, comme le montrent les droites de tendance.

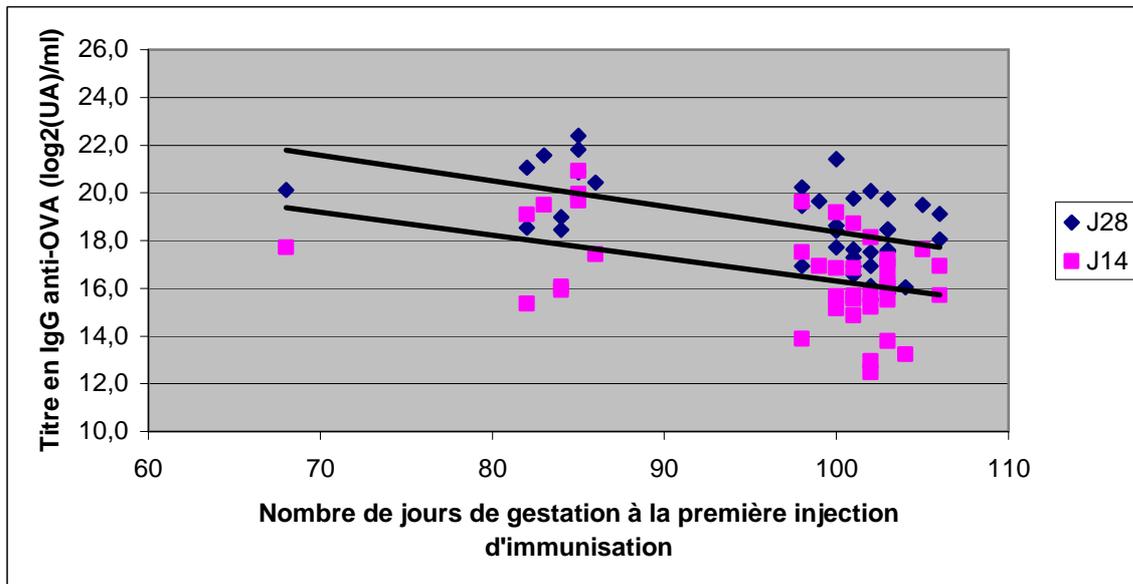


Figure 20 : Réponses anticorps à J14 et J28 en fonction du stade de gestation

On retrouve la même tendance sur le graphique qui présente les valeurs moyennes des réponses anticorps à J14 et J28 en fonction du stade de gestation au moment de la première injection immunisante.

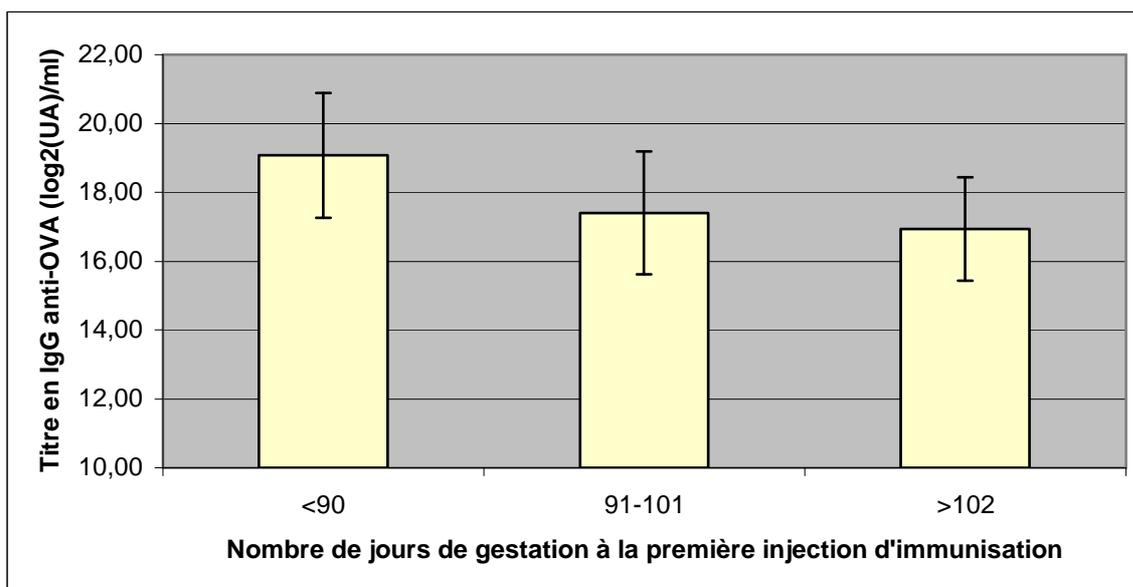
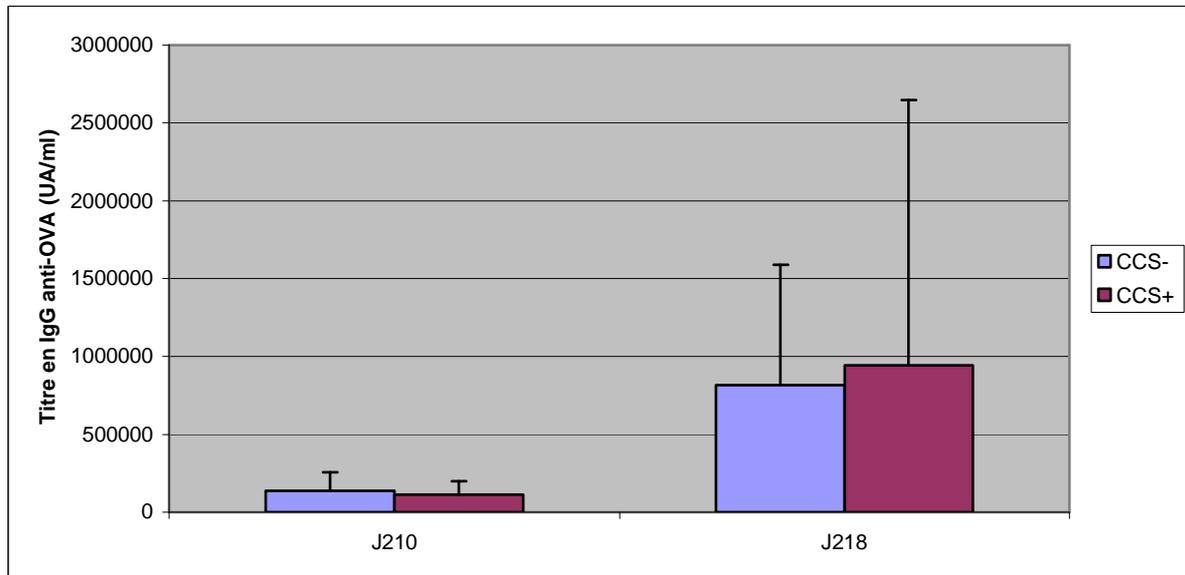


Figure 21 : Réponses anticorps moyennes (J14, J28) en fonction du stade de gestation

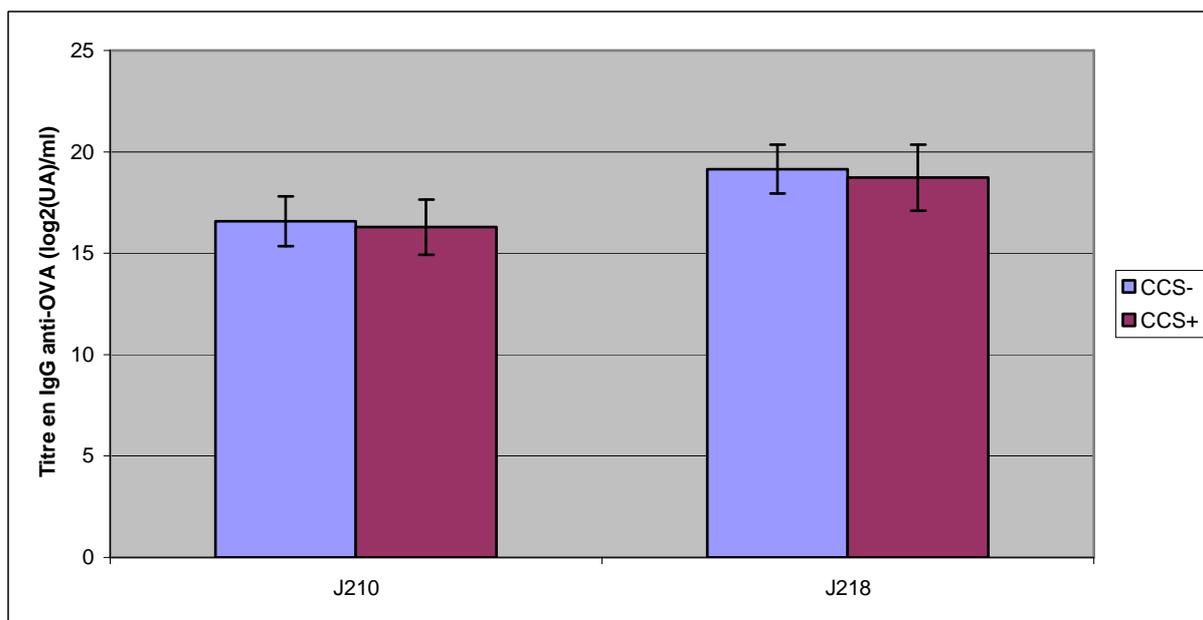
Plus l'immunisation est réalisée à un stade de gestation avancé, moins la réponse anticorps est forte. Ce résultat particulièrement intéressant sera discuté dans la dernière partie de notre document.

### 1.3. Intensité de la réponse anticorps en phase mémoire



**Figure 22 : Réponses anticorps après stimulation antigénique en phase mémoire**

Après le rappel systémique à J210, on observe une forte augmentation du taux moyen d'anticorps dans les deux groupes. En parallèle les écart-types des valeurs des deux groupes augmentent fortement eux aussi ; à J218 l'écart-type des valeurs du groupe CCS+ est beaucoup plus élevé que celui des valeurs du groupe CCS-. A J210 le taux moyen d'anticorps est plus grand dans le groupe CCS- alors qu'à J218 c'est dans le groupe CCS+ que la moyenne est la plus élevée.

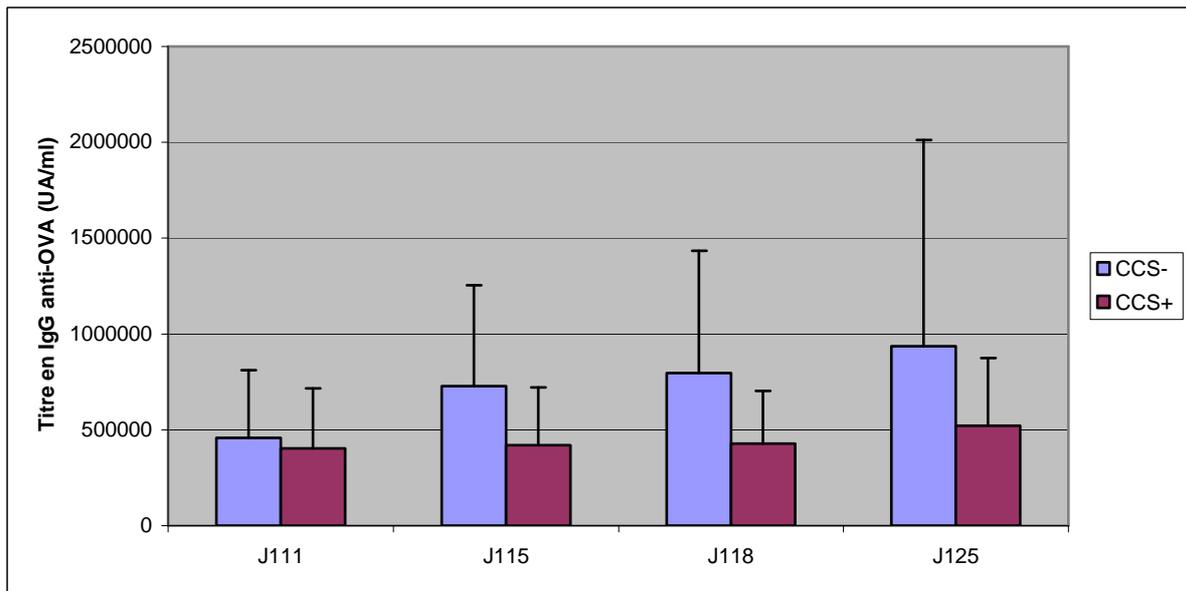


**Figure 23 : Réponses anticorps en phase mémoire après transformation logarithmique**

Après transformation logarithmique, l'augmentation de la quantité d'anticorps entre J210 et J218 est toujours visible, bien qu'atténuée. Les deux groupes ont des moyennes proches avec cette fois un léger avantage pour les brebis CCS- aux deux dates.

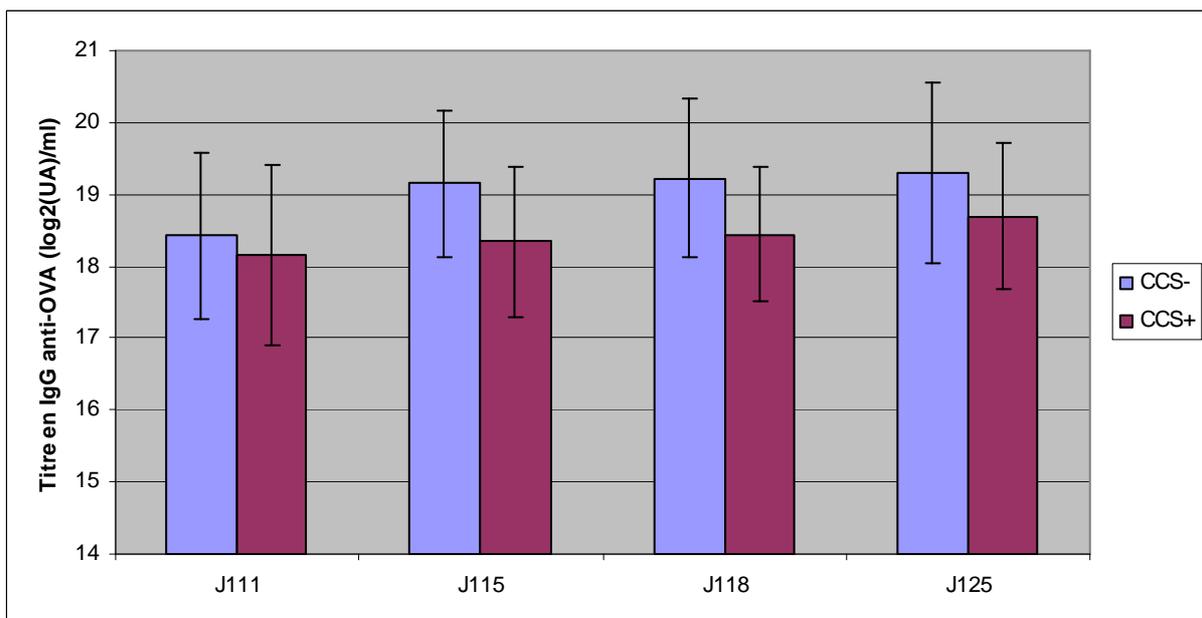
## 2. Réponse anticorps dans le sérum après stimulation antigénique intra-mammaire

Les figures 24 et 25 comparent les quantités d'anticorps du sérum des deux groupes après injection d'ovalbumine dans l'hémi-mamelle droite.



**Figure 24 : Titres sériques en anticorps après stimulation antigénique intra-mammaire**

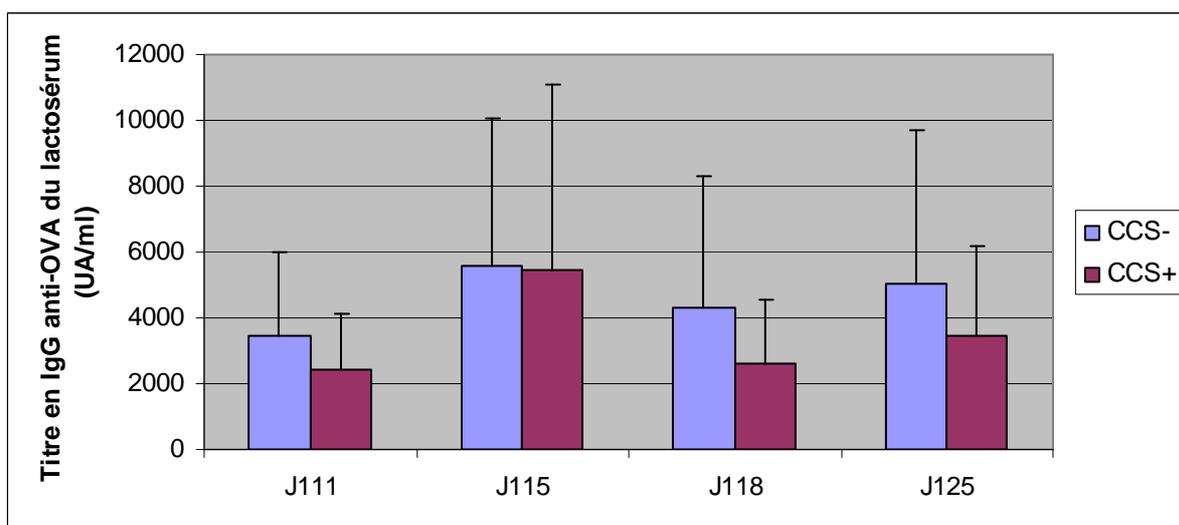
Le taux sérique d'anticorps augmente régulièrement de J111 à J125. L'augmentation est légère pour le groupe CCS+ alors qu'elle est franche pour le groupe CCS-. Au cours de la période où les mesures ont été réalisées, les taux moyens d'anticorps du groupe CCS- restent toujours supérieurs à ceux du groupe CCS+. La variabilité des valeurs du groupe CCS+ reste du même ordre alors que celle des valeurs du groupe CCS- augmente.



**Figure 25 : Réponses sériques après transformation logarithmique**

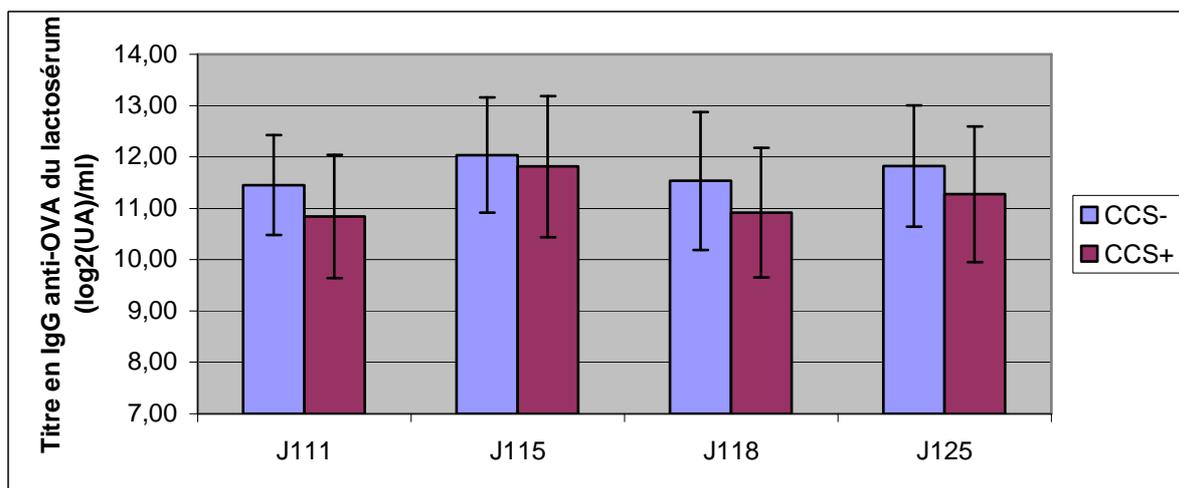
Après transformation logarithmique, l'augmentation des titres en anticorps est atténuée : les valeurs paraissent globalement constantes. Par contre, quelle que soit la date choisie, les taux moyens d'anticorps du groupe CCS- sont supérieurs à ceux du groupe CCS+.

### 3. Réponse anticorps dans le lactosérum après stimulation antigénique intra-mammaire



**Figure 26 : Titres en anticorps dans le lactosérum après stimulation antigénique intra-mammaire**

Les titres anticorps de la phase protéique du lait mesurés après challenge intra-mammaire suivent une évolution du même type pour les deux groupes. A J115 les titres moyens en anticorps augmentent nettement puis diminuent à J118 alors qu'il existe à nouveau une augmentation modérée à J125. Dès J111 et jusqu'à J125 les brebis du groupe CCS- ont des titres moyens en anticorps plus élevés que celles du groupe CCS+ ; néanmoins la différence entre les deux groupes est minimale à J115.



**Figure 27 : Titres en anticorps dans le lactosérum après stimulation antigénique intramammaire, après transformation logarithmique**

Après transformation logarithmique, l'évolution des titres anticorps est atténuée. On retrouve la différence entre les deux groupes : les titres anticorps moyens sont plus élevés dans le groupe CCS-.

#### 4. Analyse statistique : recherche des effets statistiquement significatifs

##### 4.1. En phase d'immunisation

##### 4.1.1. Variation du titre en anticorps

On observe une augmentation significative du titre en anticorps entre J0 et J14 (+6,99 en log base 2,  $p < 0,001$ ) et entre J14 et J28 (+2,13 en log base 2,  $p < 0,001$ ).

Ni la gestation ( $p = 0,66$  et  $p = 0,70$ ) ni la lignée CCS ( $p = 0,27$  et  $p = 0,42$ ) n'ont d'effet significatif sur l'évolution des titres en anticorps entre J0 et J28.

##### 4.1.2. Effet de la lignée CCS

Il existe une différence significative entre les lignées CCS de la quantité d'anticorps spécifiques dans le sérum à J28 ( $p = 0,008$ ) ; les valeurs sont plus faibles chez les

brebis CCS+ (-1,31 en log base 2). La différence est proche du seuil de significativité à J0 ( $p=0,07$ ) et J14 ( $p=0,058$ ).

#### **4.1.3. Effet du stade de gestation**

L'effectif est réparti en trois classes selon le statut gestationnel à J0 : brebis non gestantes ( $n=4$ ), brebis à moins de 90 jours de gestation ( $n=10$ ), et brebis à plus de 90 jours de gestation ( $n=28$ ).

Il existe un effet du stade de gestation sur l'intensité de la réponse anticorps anti-OVA dans le sérum à J0 ( $p=0,01$ ) et J28 ( $p=0,01$ ) chez les brebis gestantes depuis plus de 90 jours, ces dernières présentant des valeurs significativement plus basses. L'effet est plus marqué à J28 (-2,11 en log de base 2) qu'à J0 (-1,17 en log de base 2). A J14, on observe une différence proche du seuil de significativité de 5% ( $p=0,065$ ), dans le même sens (-1,82).

Par contre, les deux autres groupes relatifs à la gestation ne présentent de différence significative à aucune date de mesure.

#### **4.2. En phase mémoire**

Que ce soit à J210 ou à J218, aucun des effets testés n'est significatif, ni la lignée ( $p=0,77$  et  $P=0,41$ ), ni l'existence d'un challenge intra-mammaire préalable ( $p=0,61$  et  $p=0,94$ ), ni le statut gestationnel au moment de l'immunisation ( $p=0,83$  et  $p=0,99$ ).

Concernant l'évolution du titre en anticorps, le rappel avec l'ovalbumine en adjuvant incomplet de Freund induit une augmentation entre J210 et J218 (+3,18 en log base 2,  $p=0,005$ ) qui n'est pas significativement différente entre les deux lignées CCS ( $p=0,98$ ) et ne dépend ni du stade de gestation ( $p=0,73$ ) ni de l'existence d'une stimulation intra-mammaire préalable ( $p=0,47$ ).

### 4.3. Après stimulation antigénique intra-mammaire

Suite à la stimulation antigénique locale, les valeurs mesurées après J111 dans le sang présentent une forte corrélation entre elles (0,85-0,95). La corrélation entre les valeurs mesurées dans le sang et dans le lait est plus faible (0,4-0,6).

#### 4.3.1. Anticorps du sérum

##### 4.3.1.1. Effet de la lignée CCS

Malgré les différences apparentes observées sur les figures 24 et 25, la lignée CCS n'exerce d'effet significatif ni à J111 ( $p=0,90$ ), ni à J115 ( $p=0,14$ ), ni à J118 ( $p=0,15$ ) ni à J125 ( $p=0,42$ ).

##### 4.3.1.2. Effet du titre en anticorps sériques à J28

La quantité d'anticorps à J28 a une influence significative sur la quantité mesurée à J111 ( $p=0,025$ ), J115 ( $p=0,01$ ) J118 ( $p=0,01$ ) et J125 ( $p=0,01$ ) : une valeur élevée à J28 est associée à un titre en anticorps plus élevé (+0,35 à +0,40 en log base 2) entre J111 et J125.

##### 4.3.1.3. Evolution du titre en anticorps sériques

L'augmentation du titre en anticorps entre J111 et J115 est significative pour le groupe CCS- (+3,19 en log base 2,  $p=0,0485$ ) mais pas pour le groupe CCS+ (+2,56 en log base 2,  $p=0,09$ ). Les variations ultérieures des quantités d'anticorps ne sont pas significative ( $p=0,98$  entre J115 et J118 ;  $p=0,61$  entre J118 et J125), et ne sont influencées ni par la lignée CCS, ni par le titre en anticorps à J28.

#### 4.3.2. Anticorps du lactosérum

##### 4.3.2.1. Effet de la lignée CCS

La quantité d'anticorps lactosériques n'est pas significativement différente entre les deux lignées à J111 ( $p=0,32$ ), J115 ( $p=0,94$ ), J118 ( $p=0,45$ ) et J125 ( $p=0,53$ ).

#### 4.3.2.2. *Effet du titre en anticorps sériques à J28*

Comme dans le sérum, la quantité d'anticorps à J28 possède un effet significatif sur la quantité d'anticorps dans le lait mesurée à J111 ( $p=0,001$ ), J115 ( $p=0,05$ ), J118 ( $p=0,005$ ) et J125 ( $p=0,001$ ) : une valeur sérique élevée à J28 est associée à un titre en anticorps plus élevé dans le lait (+0,35 à +0,55 en log base 2) entre J111 et J125.

#### 4.3.2.3. *Evolution du titre en anticorps dans le lait*

Le titre en anticorps du lait augmente significativement entre J111 et J115, à la fois chez les brebis CCS- (+0,60 en log base 2,  $p=0,0055$ ) et CCS+ (+0,93 en log base 2,  $p=0,002$ ). Cette augmentation n'est pas significativement différente entre les deux lignées ( $p=0,26$ ). Entre J115 et J118, la quantité d'anticorps diminue significativement dans les deux lignées (-0,53,  $p=0,0342$  pour les CCS- et -0,84,  $p=0,027$  pour les CCS+). Cette diminution n'est pas non plus différente entre les deux lignées ( $p=0,37$ ). L'augmentation des titres en anticorps entre J118 et J125 est proche du seuil de significativité pour les brebis CCS- ( $p=0,0561$ ) et significative pour les CCS+ ( $p=0,0207$ ). L'évolution est quasiment semblable pour les deux lignées (+0,28 pour les CCS- ; +0,37 pour les CCS+, en log base 2).

Il n'y a pas d'effet du titre en anticorps à J28 sur l'intensité de l'évolution du titre en anticorps dans le lait entre les différents points de mesure.

En résumé, il n'y a pas d'effet significatif de la lignée CCS après stimulation intramammaire, sauf sur l'augmentation du titre en anticorps du sérum entre J111 et J115. On peut cependant supposer qu'un échantillon de plus grande taille aurait permis de mettre en évidence une différence plus franche entre lignées.

# DISCUSSION

Au cours de l'étude de la réponse anticorps obtenue après immunisation avec un antigène protéique en adjuvant de Freund, nous avons constaté que l'intensité de la réponse spécifique de l'antigène n'est pas la même entre les brebis des deux lignées de la sélection divergente. En effet, au cours de l'immunisation et dans une moindre mesure, après injection d'ovalbumine dans l'hémi-mamelle droite, la quantité d'immunoglobulines G (IgG) est plus élevée chez les brebis CCS- que chez les brebis CCS+. Cette différence n'est cependant pas observée dans le lait ce qui sera discuté plus loin. En outre, nous avons observé que la quantité d'anticorps spécifiques produits après l'immunisation diminue d'autant plus que la gestation de la brebis est avancée.

## 1. Analyse des résultats

A chaque fois qu'un résultat significatif est obtenu, on peut se demander si certains aspects de la méthode expérimentale ont pu être à l'origine d'un biais analytique. Dans cette partie, nous discuterons des facteurs susceptibles d'être à l'origine de ce phénomène : la méthode analytique, les effectifs des groupes CCS+ et CCS-, l'antigène, la cohorte et la génération de brebis.

### 1.1. Analyse des échantillons de sérum et de lactosérum

Le biais analytique pourrait être lié à la méthode d'analyse. La méthode de mesure de la quantité d'IgG présentes dans les échantillons de sérum et de lactosérum a été détaillée dans la partie « Matériels et méthodes ». Un même protocole ELISA a été utilisé pour tous les échantillons, avec les mêmes réactifs et le même sérum standard pour chaque plaque. Les échantillons issus des brebis CCS+ et CCS- ont été analysés en aveugle et simultanément, sur des plaques ELISA communes.

Le biais analytique éventuel est donc confondu avec la variabilité inter-individuelle prise en compte dans l'analyse statistique.

## 1.2. Effectifs

On pourrait se demander si l'effet significatif attribué à la lignée est lié à un échantillonnage biaisé ou à un déséquilibre entre les groupes CCS+ et CCS-.

L'effectif utilisé était de 22 puis 13 brebis dans le groupe CCS- et de 20 puis 11 brebis dans le groupe CCS+, selon la phase du calendrier expérimental. Ces nombres, un peu faibles, représentaient la totalité des animaux issus de la sélection divergente et disponibles à l'issue de deux années de lactation.

Il est peu probable que la différence observée soit liée à l'échantillon analysé car toutes les brebis ont été conservées dans la mesure où elles étaient gestantes et aptes à produire une troisième lactation. Il faut noter que l'effectif de chaque groupe a évolué de façon relativement parallèle au cours du temps et qu'aucune réforme volontaire n'a été réalisée.

## 1.3. Antigène modèle

L'antigène utilisé pourrait être à l'origine d'un biais si certains animaux étaient préalablement immuns vis-à-vis de celui-ci ou s'il était à l'origine d'une stimulation antigénique d'intensité variable d'une brebis à l'autre et entre les groupes.

L'ovalbumine de poule, antigène modèle pour les études immunologiques possède deux attributs importants vis-à-vis de ces questions. D'une part c'est un antigène protéique inerte, donc la stimulation antigénique est identique pour tous les animaux de l'étude. D'autre part, toutes les brebis pouvaient être considérées comme immunologiquement naïves avant la première injection. L'absence d'immunisation vis-à-vis de l'ovalbumine a été vérifiée *a posteriori* après la phase d'immunisation : à J0, le taux moyen d'anticorps est de l'ordre de 1200 UA/ml alors qu'à J14 il avoisine 250 000 UA/ml.

## 1.4. Génération et cohorte de naissance

Notre étude repose sur une seule cohorte de naissance car toutes les brebis appartenaient à la même génération. On pourrait envisager que la réponse immunitaire humorale soit soumise à un effet générationnel ; c'est une limite que l'on peut considérer dans la mesure où cela aurait pu constituer un biais dans les résultats. Une étude ultérieure a été réalisée sur des animaux de la deuxième

cohorte de naissance au sein de la sélection divergente et des effectifs plus grands ont été utilisés. En outre, ces animaux étaient issus de nouveaux béliers, qui n'avaient pas été utilisés pour la première cohorte. Des résultats très similaires ont été obtenus ce qui confirme l'existence d'une différence d'intensité de la réponse humorale entre les lignées CCS+ et CCS-. Ceci permet d'éliminer l'effet année comme biais dans les résultats obtenus.

## 2. Effet de la gestation sur la réponse immunitaire

Les résultats de la phase d'immunisation montrent que la production d'IgG est d'autant plus faible que la gestation est avancée. L'effet est significatif à J0 et J28, et proche du seuil de significativité à J14, probablement en raison de la faible taille de l'échantillon. Il faut aussi noter que parmi les 9 brebis CCS- retirées de l'étude à J111 en raison de leur mise bas trop tardive, 7 présentaient de fortes réponses anticorps lors de l'immunisation (cf. paragraphe 1.1. de la partie « Résultats »). Puisque ces brebis ont été immunisées à un stade plus précoce de leur gestation, cela confirme l'effet de cette dernière.

### 2.1. Observations publiées

Les altérations de l'immunité liées à la gestation sont démontrées depuis de nombreuses années. Chez les ruminants, la période entourant la mise bas est associée à une incidence accrue de certaines infections, notamment mammaires et utérines. De nombreux travaux de recherche ont été réalisés pour mieux comprendre ce phénomène.

Chez la vache laitière, différentes publications (Mallard, 1998 ; Detilleux, 1995 ; Vangroenweghe, 2005 ; Burvenich, 2007) décrivent des modifications des réponses immunitaires au moment du péripartum. Plusieurs effecteurs de l'immunité non-spécifique mais aussi spécifique sont concernés. Les polynucléaires neutrophiles, qui sont les cellules clés des mécanismes de défense contre les infections mammaires, ont une fonctionnalité diminuée (Burvenich, 2003 ; Burton, 2003). La réponse humorale est diminuée chez environ 60% des vaches, selon les travaux de l'équipe de Mallard (Wagter, 2000). On observe aussi une baisse de réactivité des

lymphocytes B et T aux substances mitogènes ainsi qu'une diminution de la capacité des lymphocytes à produire l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ).

Toutes ces modifications aboutissent à une diminution globale de la qualité des réponses immunitaires, ce qui explique probablement la sensibilité plus marquée aux infections.

Chez les ovins, les travaux les plus pertinents sur le sujet ont été réalisés par Reynolds et Griffin (Reynolds, 1986 ; Reynolds, 1990), qui ont comparé la réponse humorale chez des brebis en fonction de leur stade physiologique au moment de l'immunisation. Les groupes étaient au nombre de quatre : brebis non gravides, brebis immunisées avant la conception, brebis immunisées en début de gestation (21 à 35 jours de gestation), et brebis immunisées en fin de gestation (98 à 112 jours de gestation). La durée moyenne de gestation des brebis est de 5 mois, soit 150 jours.

La réponse primaire est modifiée de façon variable selon l'antigène utilisé. L'immunisation à l'aide d'un vaccin vivant atténué contre *Brucella abortus* a montré une production plus forte d'IgM chez les brebis gestantes, alors que le phénomène inverse a été obtenu lors de l'immunisation avec l'albumine sérique bovine.

Lors de la réponse secondaire, les brebis gestantes ont une production d'IgM plus forte et une production d'IgG1 plus faible que les brebis non gestantes.

Ces résultats indiquent une baisse de la commutation isotypique chez les brebis gestantes, ainsi qu'un défaut de mémoire immunitaire. Ces altérations sont d'autant plus prononcées que la gestation est avancée et elles disparaissent rapidement après la mise-bas.

Notre étude a comparé les réponses anticorps IgG chez des brebis qui ont reçu la première injection antigénique alors qu'elles étaient gestantes depuis une durée variable de 68 à 106 jours, c'est-à-dire plutôt vers le milieu ou la fin de la gestation. La fenêtre de temps de notre étude est donc plus étroite, mais les résultats obtenus vont dans le même sens : la réponse anticorps IgG s'amenuise à mesure que la gestation avance.

## 2.2. Interprétation

L'interprétation de ces résultats n'est pas aisée, car les mécanismes responsables de la modification de la réponse immunitaire humorale sont encore largement méconnus, et ce malgré de nombreux travaux de recherche.

De manière générale, on peut faire l'hypothèse que le profil endocrinien associé à la gestation est en cause. Les hormones stéroïdiennes comme la progestérone et l'oestradiol, l'hormone de croissance et peut-être certaines cytokines pourraient exercer un contrôle négatif sur certaines activités lymphocytaires. Par exemple, le défaut de commutation isotypique chez les brebis en gestation trouve sans doute son origine dans une fonctionnalité altérée des LT auxiliaires (LT CD4). De même, il a été montré que les LT CD8 de la mamelle présentent une activité immunosuppressive inhabituellement grande au péripartum.

La période correspondant à la fin de la gestation est également associée à des modifications de la distribution des LT dans l'organisme : diminution des LT présents dans la mamelle et du rapport CD4/CD8 dans le lait et dans le sang. La répartition de ces cellules se fait par le jeu de protéines membranaires dont l'expression est probablement régulée par les hormones et les cytokines produites pendant la gestation.

Une étude de Mallard et ses collègues (Mallard, 1997) décrit l'influence de 3 hormones – l'hormone de croissance (GH), le facteur de croissance insuline-like 1 (IGF1) et le cortisol – sur la réponse humorale des vaches laitières au péripartum. Une corrélation positive est observée entre les concentrations en anticorps et en GH, une corrélation négative entre les concentrations en anticorps et en IGF1. L'étude ne démontre cependant pas de relation de cause à effet.

En résumé, si les mécanismes sous-jacents méritent encore d'être explorés, il est clair que la gestation a une influence significative sur les fonctions immunitaires. Nos résultats illustrent bien cette réalité.

## 3. Variabilité génétique de la réponse humorale

### 3.1. Rappel des résultats

Notre étude met en évidence une différence de production d'IgG entre les brebis des lignées CCS : le groupe CCS- produit des anticorps en plus grande quantité que le groupe CCS+. En phase d'immunisation, la différence est significative à J28 et proche du seuil de significativité à J0 et J14. Après la stimulation intra-mammaire, seule l'évolution des anticorps du sérum de J111 à J115 est différente entre lignées. Après le rappel systémique à J210, il n'y a pas de différence entre lignées. Le fait que les résultats ne soient pas toujours significatifs s'explique sans doute en partie par la faible taille de l'échantillon. De plus, 7 des 9 brebis CCS- retirées de l'étude de J111 à J125 présentent de fortes réponses anticorps à J14 et J28, ce qui renforce l'effet lignée. La sélection génétique sur le critère CCS - un indicateur essentiellement associé à la réponse immunitaire non spécifique - a donc provoqué ou est associée à une modification de la réponse immunitaire spécifique à médiation humorale. En d'autres termes, il est très probable que la différence de production d'anticorps entre les lignées de brebis de notre étude soit d'origine génétique. C'est l'héritabilité ( $h^2$ ) qui est généralement utilisée pour apprécier la part de variabilité d'origine génétique d'un caractère donné, car elle est définie par le rapport entre la variance d'origine génétique et la variance phénotypique. Dans le prochain paragraphe, nous rapportons les principaux travaux ayant été effectués sur la variabilité génétique de la réponse anticorps chez les ruminants, mais aussi dans d'autres espèces. Nous formulerons ensuite des hypothèses sur l'origine de la variabilité de la réponse humorale entre les brebis de notre étude.

### 3.2. Observations publiées

#### 3.2.1. Chez les ruminants

Chez les ovins, deux études à grande échelle ont analysé les paramètres génétiques de la réponse immunitaire.

L'équipe de Berggren-Thomas a mesuré la réponse anticorps anti-ovalbumine de 616 brebis, dont 378 étaient gestantes (Berggren-Thomas, 1987). L'héritabilité de la

réponse anticorps est de  $0,27 \pm 0,17$  pour l'ensemble des brebis et, chose remarquable, elle s'élève à  $0,57 \pm 0,25$  pour les brebis gestantes. Face à ce résultat, les auteurs évoquent la possibilité d'une variation du déterminisme génétique de la réponse humorale lors de la gestation. Le nombre de fœtus *in utero* ne constitue pas un facteur significatif de variation, mais l'effet de la gestation elle-même n'est pas analysé. Contrairement à notre étude, le stade de gestation lors de l'immunisation n'a pas d'effet significatif, cependant ce paramètre variait peu entre les animaux de l'échantillon analysé.

Plus récemment, Moreno a publié une analyse des paramètres génétiques de la résistance à *Salmonella abortusovis* chez 1216 agneaux (Moreno, 2003). Les taux d'IgM et d'IgG1 sont mesurés à J0 et J7 et leurs variations entre les deux dates sont calculées. Le taux d'IgG1 à J0 présente une faible héritabilité de 0,14, probablement liée à la présence résiduelle d'anticorps maternels. Par contre, le taux d'IgM à J0 et les variations des IgM et des IgG1 sont très héritables (respectivement 0,37, 0,64 et 0,30).

Dans l'espèce bovine, nous avons choisi trois travaux parmi ceux qui ont été réalisés et publiés.

O'Neill a étudié l'influence de la variabilité génétique sur la réponse humorale de jeunes bovins après vaccination contre le virus respiratoire syncytial bovin (O'Neill, 2006). L'expérimentation, qui porte sur un large effectif de 463 veaux, met en évidence un effet marqué de la paternité sur la production d'IgG et d'IgG1 en particulier, associé à une héritabilité de l'ordre de 0,30.

Detilleux a analysé plusieurs paramètres de la réponse immunitaire au péripartum chez des vaches laitières Prim'Holstein (Detilleux, 1994). Les auteurs ont mesuré une forte héritabilité pour le nombre et la fonctionnalité des neutrophiles (migration, phagocytose et destruction des bactéries), pour le nombre et la réponse aux mitogènes des lymphocytes, et pour la production d'IgM, d'IgG1 et d'IgG2. Bien que le risque de surestimation des valeurs soit grand à cause de la faible taille de l'échantillon, cette étude montre une grande variabilité d'origine génétique de l'immunodépression en péripartum, qui a été mise en évidence dans les différents aspects de la réponse immunitaire.

Les travaux de l'équipe de Mallard sont particulièrement intéressants à comparer avec notre étude, car ils concernent la réponse humorale en péripartum après immunisation avec l'ovalbumine (Wagter, 2000). Cent trente six vaches et génisses appartenant à trois troupeaux sont classées en trois groupes (forts, moyens, et faibles répondeurs) selon l'intensité de la réponse anticorps. Signalons au passage que nous avons, nous aussi, observé qu'environ un tiers des brebis CCS- fournissent une réponse anticorps nettement plus forte que les autres (cf. paragraphe 1.1. de la partie « Résultats »). L'héritabilité varie de 0,32 à 0,62 en fonction de la date de la mesure. Les trois groupes sont associés à des incidences de mammites différentes : globalement le groupe « low antibody » développe plus fréquemment des mammites. Dans un des trois troupeaux, c'est le groupe fort répondeur qui est le plus atteint ; cependant, dans ce dernier cas il s'agit uniquement de génisses et on sait par ailleurs que les mammites des génisses sont difficilement comparables à celles des autres vaches laitières. Chose remarquable, la classification des animaux selon la production d'anticorps semble associée à une variation des CCS : dans un des trois troupeaux, les CCS du groupe « high antibody » sont significativement plus faibles. Bien qu'il mérite d'être confirmé, ce résultat rappelle la relation inverse entre CCS et réponse anticorps que nous avons mise en évidence.

### **3.2.2. Chez le porc**

Dans l'espèce porcine, il existe aussi une variabilité génétique de la réponse immunitaire. Wilkie et Mallard ont réalisé une sélection divergente portant à la fois sur la réponse cellulaire et humorale (Wilkie, 1999). L'héritabilité des différents indicateurs immunitaires pris en compte s'échelonne entre 0,07 et 0,27. Après trois générations, les valeurs EBV (Estimated Breeding Values) des deux lignées diffèrent de 2 écarts types génétiques, ce qui correspond à une différence significative. Les animaux de la lignée HIR (High Immune Responsiveness) présentent une meilleure réponse à la vaccination et un gain de poids supérieur à ceux des autres lignées. Ils montrent aussi une tendance plus marquée à générer une forte inflammation.

### **3.2.3. Chez le poulet**

Chez le poulet, Pinard et son équipe (Pinard, 1992 ; Pinard, 1993) ont effectué une sélection divergente sur la réponse humorale après immunisation contre les

hématies de moutons. L'héritabilité est respectivement de 0,21 et 0,25 pour les lignées L (Low) et H (High) et dès la troisième génération, les différences entre lignées sont significatives. Après exposition au virus de la Maladie de Marek, la mortalité est plus élevée et plus précoce chez les poulets de la lignée L (Low, faible production d'anticorps) que chez ceux de la lignée témoin. Pour les poulets de la lignée H (High) par contre, il n'y a pas de différence de taux de mortalité, même si la mort survient plus tard.

#### **3.2.4. Chez la souris**

Chez la souris, plusieurs sélections divergentes ont été effectuées sur des caractères immunitaires différents. Il s'agit en particulier des travaux des équipes de Biozzi et de Ribeiro.

La sélection divergente de Biozzi portait sur la réponse anticorps après immunisation avec des hématies de moutons (Biozzi, 1979). Dans les deux populations de souris d'origine, l'héritabilité est respectivement évaluée à 0,35 et 0,23. Après 13 et 16 générations, la limite de sélection est atteinte, indiquant que l'ensemble des animaux est alors homozygote pour les gènes déterminant la production des anticorps en question. Le déterminisme génétique de la réponse immunitaire humorale sera d'ailleurs abordé dans un prochain paragraphe.

Les travaux de Ribeiro portent sur la réaction inflammatoire aiguë (Biozzi, 1998 ; Vigar, 2000) ; ils sont intéressants à comparer avec les nôtres dans la mesure où nous avons observé que la sélection sur le critère CCS a un effet sur l'intensité de la réponse inflammatoire. Deux lignées de souris ont été sélectionnées, respectivement pour une réaction inflammatoire aiguë maximale et minimale. Si la production d'IgG est similaire dans les deux lignées, l'orientation de la réponse immunitaire, par contre, est modifiée : les souris de la lignée AIRmax (Acute Inflammatory Reactivity max) ont une réponse plutôt orientée Th2 contrairement à celles de la lignée AIRmin qui ont une réponse plutôt Th1. A l'issue de la sélection, les souris de la lignée AIRmax sont plus sensibles à l'arthrite induite par le pristane, mais plus résistantes à la tumorigenèse cutanée, deux affections qui correspondent à des mécanismes immunitaires différents.

Ces résultats montrent qu'une sélection divergente sur un caractère quantitatif de la réponse immunitaire a une influence, quantitative ou qualitative, sur les autres modalités de réponse.

### 3.2.5. Chez l'homme

Dans l'espèce humaine, deux études témoignent d'une variabilité génétique de la réponse immunitaire humorale.

L'équipe de Tan a mesuré la réponse IgG chez 100 paires de jumeaux après vaccination contre la rougeole, les oreillons et la rubéole (Tan, 2001). Dans les trois cas, l'héritabilité est significativement différente de zéro ; elle est évaluée respectivement à  $0,89 \pm 0,22$ ,  $0,39 \pm 0,23$  et  $0,46 \pm 0,25$ , ce qui est particulièrement élevé.

Une autre étude, réalisée chez 29 patients adultes, évalue l'influence du polymorphisme des gènes de plusieurs cytokines (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, IL-10, TGF $\beta$ 1) sur la réponse immunitaire (Gentile, 2003). Le gène codant pour la production de TNF $\alpha$  contribue de manière significative à la réponse IgG dans le sérum, tandis que celui codant pour l'IFN $\gamma$  a un effet significatif sur la production d'IgA dans les sécrétions nasales.

## 3.3. Interprétation

Les différentes publications qui viennent d'être citées attestent l'existence d'une forte variabilité génétique de la réponse immunitaire humorale. L'héritabilité est de l'ordre de 0,30 ; en d'autres termes, environ un tiers de la variabilité de la réponse anticorps est liée au patrimoine génétique, et ce quelles que soient les espèces où elle a été évaluée. La question qui se pose maintenant est celle de l'origine de cette variabilité. Quels sont les gènes dont le polymorphisme influe sur la réponse anticorps ?

### 3.3.1. Déterminisme génétique de la réponse humorale

Les connaissances à ce sujet, bien qu'en constante progression, restent largement incomplètes à ce jour. Il est généralement admis que la réponse immunitaire humorale suit un déterminisme polygénique comportant plusieurs QTL (Quantitative Trait Loci). Chez la souris, Biozzi a évalué leur nombre à 10 et 6 en se basant sur deux sélections divergentes distinctes de 13 et 16 générations comprenant une centaine d'individus chacune (Biozzi, 1979). Certains de ces gènes exercent probablement une dominance incomplète, car la sélection n'est pas aussi efficace dans les lignées H et L.

D'après les nombreuses études publiées sur la question, on peut faire une distinction, parmi les gènes impliqués, entre ceux qui sont liés au CMH et les autres. Concernant les gènes liés au CMH, l'équipe de Mallard a comparé les réponses immunitaires de 124 vaches Holstein après infection expérimentale par *Staphylococcus aureus* en fonction des allèles du gène BoLA (Bovine Lymphocyte Antigen) qui code pour le CMH de classe I (Mallard, 1995). Les résultats montrent un effet significatif des allèles sur la réponse des lymphocytes aux signaux mitogènes, ainsi que sur la production d'anticorps totaux dans le sérum et celle d'anticorps et d'IgG1 dans le lait.

Une autre étude de Glass, Oliver et Spooner (Glass, 1990) indique qu'il existe un effet significatif des allèles du CMH de classe II sur la prolifération des lymphocytes T après immunisation avec l'ovalbumine. Les gènes du CMH de classe II participent donc eux aussi au déterminisme de la réponse immunitaire.

Concernant les gènes qui ne sont pas liés au CMH, les travaux de Ribeiro (Biozzi, 1998 ; Vigar, 2000) sur la réaction inflammatoire aiguë chez la souris montrent que de nombreux gènes agissent en commun ou en interaction sur les différents volets de la réponse immunitaire. Les gènes du CMH ne sont donc pas les seuls impliqués. De plus, l'équipe de Gentile (Gentile, 2003) a observé chez l'homme une influence significative des gènes codant pour les cytokines TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) et IFN $\gamma$ . L'importance de ce résultat sera soulignée dans quelques paragraphes.

Ces quelques données nous donnent un aperçu, certes incomplet, de la diversité des gènes dont le polymorphisme participe à la variabilité de la réponse immunitaire humorale, telle que nous l'avons observée dans nos résultats.

### **3.3.2. Relation entre réponse humorale et CCS**

La question qui se pose ensuite est celle du lien entre le déterminisme de la réponse humorale et celui des CCS. Les deux lignées de brebis de notre étude proviennent d'une sélection divergente sur le critère CCS. Le déterminisme génétique de ce dernier caractère présente-t-il des points communs avec celui de la réponse immunitaire humorale ?

Nous disposons de deux arguments pour répondre par l'affirmative. Premièrement, une étude de l'équipe de Dietz démontre que le gène du CMH de classe II contribue de manière significative à l'évolution des CCS (Dietz, 1997). Ce lien est cependant très largement discuté actuellement et les conclusions varient beaucoup en fonction des études.

Notre deuxième argument provient de la revue de Khatkar sur les QTL identifiés chez les bovins laitiers (Khatkar, 2004). Parmi les nombreux QTL impliqués dans le déterminisme des CCS, l'un est localisé à proximité d'un gène du CMH, et un autre est situé dans une région comportant 4 loci codant pour la production d'interférons. Ceci suggère que les gènes codant pour le CMH et ceux codant pour certaines cytokines influencent les valeurs de CCS.

Il est donc probable que des gènes soient communs au déterminisme des CCS et à celui de la réponse anticorps. Cela nous amène à formuler une première explication à la différence de production d'IgG entre les brebis CCS+ et CCS- : les allèles sélectionnés par la sélection divergente sur le critère CCS sont peut-être pour partie responsables de la différence de réponse humorale. A cet égard, l'écart proche du seuil de significativité à J0 est particulièrement évocateur.

## 4. Réponse immunitaire humorale et lignée CCS

### 4.1. Interactions entre anticorps et CCS

Le paragraphe 3 de la partie « Résultats » fait apparaître une quantité plus importante d'IgG dans le lait des brebis CCS-, après stimulation antigénique intramammaire. Cependant l'analyse statistique ne met pas en évidence de différence significative entre lignées. La différence observée aux figures 26 et 27 peut donc être liée au hasard, mais elle est plus probablement due à une taille trop réduite de l'échantillon. Nous envisagerons donc ici, au moins sur le plan intellectuel, la possibilité d'une différence de réponse anticorps dans le lait entre lignées. Ce point a son importance, car les anticorps du lait peuvent contribuer à la différence de CCS en participant à la lutte contre les infections de la glande mammaire.

Dès 1979, Lascelles mentionnait une contribution des anticorps aux défenses de la mamelle (Lascelles, 1979) : les IgA et IgM inhibent l'adhésion des Staphylocoques à l'épithélium mammaire et les IgG2 stimulent le fonctionnement des neutrophiles.

Un article de Gonzalez, publié en 1989, démontre que la vaccination systémique de vaches laitières contre *Escherichia coli* est associée à une baisse significative des mammites cliniques (Gonzalez, 1989). Ceci ne permet cependant pas de savoir si l'immunité protectrice est à médiation cellulaire ou humorale.

Hogan et son équipe ont étudié le pouvoir opsonisant du lactosérum de 12 vaches laitières après vaccination systémique contre la même bactérie (Hogan, Todhunter, 1992). Les vaches vaccinées ont une opsonisation plus forte, qui est corrélée avec le taux d'IgM mais pas celui des IgG. Signalons tout de même que l'échantillon est de petite taille et que l'étude ne distingue pas IgG1 et IgG2.

Une étude ultérieure de la même équipe, réalisée sur 20 vaches, montre que la vaccination contre *Escherichia coli* ne diminue pas l'incidence des mammites cliniques mais réduit leur sévérité (Hogan, Weiss, 1992). De plus, les vaches vaccinées ont un taux d'IgG plus élevé dans le sérum et le lactosérum.

Enfin, une équipe argentine a démontré l'efficacité de la vaccination contre un autre germe : *Staphylococcus aureus* (Calzolari, 1997). L'incidence des mammites cliniques et subcliniques est diminuée par la vaccination. Les CCS sont également significativement réduits chez les animaux vaccinés présentant un comptage inférieur à 500 000 cellules/ml au début de l'expérimentation.

Comme ces références l'attestent, les anticorps sont partie prenante des défenses mammaires contre les infections. On peut donc imaginer qu'en facilitant l'élimination des bactéries, ils participent à la diminution de l'inflammation mammaire et permettent une diminution du recrutement des leucocytes, à la fois en intensité et en durée. Il en résulte alors une diminution du CCS moyen pendant la lactation chez les brebis produisant le plus d'anticorps.

Par ailleurs, il faut noter qu'il existe une interaction fonctionnelle spécifique entre les granulocytes neutrophiles et les IgG2.

En 1983, Mallard a observé une corrélation entre les mammites cliniques et le taux d'IgG2 chez des vaches laitières (Mallard, 1983), ce qui évoque un rôle particulier de cet isotype. Les résultats obtenus par l'équipe de Leitner en 2000 suggèrent l'existence d'un transport actif spécifique aux IgG2 lors de mammité à *Staphylococcus aureus* (Leitner, 2000).

Les essais *in vitro* réalisés par Tao, Corbett et Pickett démontrent que les IgG2 peuvent activer les granulocytes neutrophiles, contrairement aux autres isotypes d'immunoglobulines (Tao, 1995). Ce résultat avait d'ailleurs été rapporté auparavant par McGuire (McGuire, 1979).

Il existe donc une véritable coopération fonctionnelle entre les polynucléaires neutrophiles et les IgG2, qui peut expliquer que les brebis produisant ces anticorps en plus grande quantité n'ont pas besoin de recruter autant de neutrophiles que les autres brebis. Si cette hypothèse est correcte, l'intensité de la production d'IgG2 est inversée par rapport à la valeur des CCS. L'intérêt du dosage spécifique des IgG2 sera souligné dans quelques lignes.

## 4.2. Perspectives

Comme nous l'avons suggéré dans les paragraphes précédents, la différence de réponse humorale entre les deux lignées de brebis peut être considérée soit comme la cause, soit comme la conséquence du caractère CCS+ ou CCS-.

En effet, si les anticorps contribuent significativement à la lutte contre les infections de la mamelle, alors les brebis ayant la plus forte production d'anticorps ont une inflammation mammaire moins intense et donc des CCS plus faibles. Dans ce cas, c'est la différence de production d'anticorps qui est à l'origine de la différence de CCS entre les deux lignées de brebis.

Par ailleurs, nous avons vu qu'il existe probablement des gènes communs au déterminisme des CCS et à celui de la production d'anticorps. Si les allèles associés à des CCS faibles sont aussi responsables de productions d'anticorps élevées, et inversement pour les CCS élevés, alors la différence de réponse humorale entre les deux groupes de brebis est liée à la sélection sur le critère CCS et non pas à l'efficacité des anticorps dans la lutte contre les infections.

Dès lors, comment déterminer laquelle de ces hypothèses est vraie ? Nous proposons dans cette partie différents travaux qui pourraient permettre d'évaluer la contribution des anticorps à la lutte contre les infections mammaires d'une part et de rechercher d'éventuels mécanismes, signaux et/ou gènes communs à la réponse humorale et à l'évolution des CCS d'autre part.

Notre étude est basée sur une réaction inflammatoire expérimentale déclenchée par l'ovalbumine associée à l'adjuvant de Freund.

Nous nous sommes appuyés sur l'hypothèse selon laquelle l'antigène modèle utilisé donne un reflet fiable de la réponse humorale contre les pathogènes courants. Cette assertion mérite d'être vérifiée, en utilisant un autre antigène modèle comme le lysozyme d'œuf de poule (Henn Egg Lysozyme) et surtout en comparant les réponses humorales des brebis contre les Staphylocoques, pathogènes mammaires les plus courants chez la brebis. Le dosage des IgG2 sera le plus pertinent pour répondre à cette question, étant données les caractéristiques de cet isotype que nous avons rapportées précédemment. Une différence de production d'IgG2 anti-Staphylocoques entre les brebis CCS+ et CCS- pèserait en faveur d'un rôle significatif des anticorps dans la lutte contre les infections.

L'influence de l'adjuvant de Freund porte elle aussi à réflexion. En effet, la composition de cet adjuvant inclut des parois de Mycobactéries, et on sait par ailleurs (Texereau, 2005) que le système immunitaire reconnaît les Mycobactéries et les Staphylocoques par un récepteur commun, le TLR2 (Toll-Like Receptor 2). On peut donc imaginer que l'adjuvant de Freund partage des voies de signalisation avec l'infection à Staphylocoques. Ce point mérite d'être vérifié par l'utilisation d'un autre adjuvant comme l'association saponine-alum ou l'hydroxyde d'alumine seul. Là encore, une contribution significative de l'adjuvant de Freund à la différence de réponse anticorps entre les brebis CCS+ et CCS- constituerait un argument en faveur de l'hypothèse mentionnée plus haut.

Si la présente étude se limite à la comparaison des IgG totales entre les deux groupes de brebis, l'étape suivante sera de doser séparément les IgG1 et IgG2 car les deux isotypes ne remplissent pas les mêmes fonctions (McGuire, 1979), et leur déterminisme est différent. Comme nous l'avons mentionné dans le tableau 3 de l'introduction, l'IL-4 et l'IL-13 induisent la production d'IgG1 tandis que l'IFN $\gamma$  induit la

production d'IgG2 et inhibe celle d'IgG1. La mise en évidence ou non d'une différence de production de l'un et/ou l'autre des deux isotypes permettra de faire un pas de plus dans la compréhension des différences de réponse inflammatoire entre les deux lignées de brebis. En effet, si certains signaux et gènes mis en jeu dans la différence de réponse humorale entre les brebis CCS+ et CCS- sont aussi impliqués dans le déterminisme de l'évolution des CCS, nous pourrions apporter un crédit plus important à la deuxième hypothèse.

Une autre perspective concerne le dosage de certaines cytokines, en particulier l'IFN $\gamma$ . Cette cytokine fait partie des protéines de la phase aiguë de l'inflammation, produites en début d'infection. Elle est impliquée d'une part dans la différenciation des LB en plasmocytes producteurs d'IgG2 (Burton, 2003 ; Estes, 1996), d'autre part dans le recrutement et l'activation des neutrophiles (Burton, 2003 ; Riollet, 2000). L'IFN $\gamma$  constitue donc un carrefour physiologique entre la réponse humorale et l'évolution des CCS, ce qui justifie de comparer sa production en début de réaction inflammatoire entre les brebis des deux groupes de la sélection divergente. La mise en évidence d'une différence sera en faveur de la deuxième hypothèse présentée au début de ce paragraphe.

Enfin, la possibilité de gènes communs au contrôle de l'intensité de la production des anticorps et à celui de l'évolution des CCS après infection reste hypothétique à ce jour. La comparaison des allèles des gènes pertinents - ceux codant pour le CMH par exemple - entre les brebis des deux lignées pourra être envisagée le cas échéant. Par ailleurs, d'autres techniques d'analyse génétique sont actuellement envisagées pour comparer les brebis CCS+ et CCS- et approcher les gènes responsables des différences de réponse inflammatoire et humorale entre les deux lignées.

## 5. Conclusion

Notre étude sur les brebis CCS+ et CCS- constitue la première caractérisation connue d'ovins présentant des réponses inflammatoires mammaires différentes aux infections bactériennes. De façon plus ou moins inattendue, nous avons découvert que les brebis des lignées CCS+ et CCS- produisent une réponse anticorps différente ; cette différence a d'ailleurs été confirmée par des études ultérieures. Ce résultat n'est pas sans rappeler ceux obtenus par Biozzi et Ribeiro chez la souris. Dans un futur relativement proche, l'analyse du polymorphisme génétique des brebis CCS+ et CCS- devrait permettre d'identifier les régions génétiques et les gènes qui contrôlent la réponse inflammatoire dont l'intensité est différente entre les deux lignées de brebis.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

**Mr MECHIN Pierre**

a été admis(e) sur concours en : 2003

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 10 Juillet 2008

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, Gilles FOUCRAS, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

autorise la soutenance de la thèse de :

**Mr MECHIN Pierre**

intitulée :

« Etude de la variabilité de la production d'anticorps après immunisation en relation avec une sélection génétique sur la réponse inflammatoire mammaire chez la brebis. »



Le Professeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Docteur Gilles FOUCRAS

Vu :



Le Directeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Professeur Alain MILON

**Professeur Antoine BLANCHER**

**CHEF DE SERVICE**

Tél. 05 61 32 28 53

**LABORATOIRE IMMUNOLOGIE**

**CHU TOULOUSE - Hôpital Rangueil**

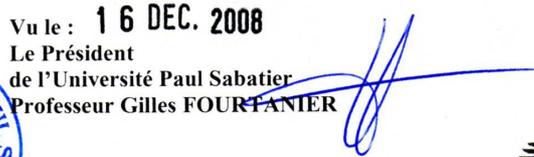
TSA 50032

Vu : 31059 TOULOUSE Cedex 9

Le Président de la thèse :  
Professeur Antoine BLANCHER



Vu le : 16 DEC. 2008



Le Président  
de l'Université Paul Sabatier  
Professeur Gilles FOURFANIER

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BERGGREN-THOMAS, P.L., KAATTARI, S., HOHENBOKEN, W.D., *et al.*  
Inheritance of active and acquired immunity traits in sheep  
*J. Anim. Sci.*, 1987, **64**, 1302-1312
- BIOZZI, G., MOUTON, D., HEUMANN, A.-M., *et al.*  
Genetic analysis of antibody responsiveness to sheep erythrocytes in crosses between lines of mice selected for high or low antibody synthesis  
*Immunology*, 1979, **36**, 427-438
- BIOZZI, G., RIBEIRO, O.G., SARAN, A., *et al.*  
Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse  
*Carcinogenesis*, 1998, **19 (2)**, 337-346
- BURTON, J.L., ERSKINE, R.J.  
Immunity and mastitis, Some new ideas for an old disease  
*Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 2003, **19**, 1-45
- BURVENICH, C., BANNERMAN, D.D., LIPPOLIS, J.D., *et al.*  
Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period  
*J. Dairy Sci.*, 2007, **90 (E. Suppl.)**, 39-54
- BURVENICH, C., VAN MERRIS, V., MEHRZAD, J., *et al.*  
Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors  
*Vet. Res.*, 2003, **34**, 521-564
- CALZOLARI, A., GIRAUDO, J.A., RAMPONE, H., *et al.*  
Field trial of a vaccine against bovine mastitis. 2. Evaluation in two commercial dairy herds  
*J. Dairy Sci.*, 1997, **80**, 854-858
- DETILLEUX, J.C., KEHRLI, M.E., STABEL, J.R., *et al.*  
Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production  
*Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1995, **44**, 251-267
- DETILLEUX, J.C., KOEHLER, K.J., FREEMAN, A.E., *et al.*  
Immunological parameters of periparturient Holstein cattle: genetic variation  
*J. Dairy Sci.*, 1994, **77**, 2640-2650
- DIETZ, A.B., COHEN, N.D., TIMMS, L., *et al.*  
Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows  
*J. Dairy Sci.*, 1997, **80**, 406-412
- ESTES, D.M.  
Differentiation of B cells in the bovine. Role of cytokines in immunoglobulin isotype expression  
*Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1996, **54**, 61-67

- ESTES, D.M., BROWN, W.C.  
Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle  
*Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2002, **90**, 1-10
- GENTILE, D.A., DOYLE, W.J., ZEEVI, A., *et al.*  
Cytokine gene polymorphisms moderate responses to Respiratory Syncytial Virus in adults  
*Hum. Immunol.*, 2003, **64**, 93-98
- GLASS, E.J., OLIVER, R.A., SPOONER, R.L.  
Variation in T cell responses to ovalbumin in cattle: evidence for Ir gene control  
*Anim. Genet.*, 1990, **21**, 15-28
- GONZALEZ, R.N., CULLOR, J.S., JASPER, D.E., *et al.*  
Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Escherichia coli* vaccine  
*Can. J. Vet. Res.*, 1989, **53**, 301-305
- HOGAN, J.S., TODHUNTER, D.A., TOMITA, G.M., *et al.*  
Opsonic activity of bovine serum and mammary secretion after *Escherichia coli* J5 vaccination  
*J. Dairy Sci.*, 1992, **75**, 72-77
- HOGAN, J.S., WEISS, W.P., TODHUNTER, D.A., *et al.*  
Efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine in an experimental challenge trial  
*J. Dairy Sci.*, 1992, **75**, 415-422
- JANEWAY, TRAVERS, WALPORT, SHLOMCHIK  
Immunobiologie. 2<sup>e</sup> edition. Bruxelles : De Boeck, 2003. 782 p.
- KHATKAR, M.S., THOMSON, P.C., TAMMEN, I., *et al.*  
Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis  
*Genet. Sel. Evol.*, 2004, **36**, 163-190
- KOSSAIBATI, M.A., ESSLEMONT, R.J.  
The cost of production diseases in dairy herds in England  
*Vet. J.*, 1997, **154**, 41-51
- LASCELLES, A.K.  
The immune system of the ruminant mammary gland and its role in the control of mastitis  
*J. Dairy Sci.*, 1979, **62**, 154-160
- LEITNER, G., YADLIN, B., GLICKMAN, A., *et al.*  
Systemic and local immune response of cows to intramammary infection with *Staphylococcus aureus*  
*Res. Vet. Sci.*, 2000, **69**, 181-184
- MALLARD, B.A., BURNSIDE, E.B., BURTON, J.H., *et al.*  
Variation in serum immunoglobulin in Canadian Holstein-Friesians  
*J. Dairy Sci.*, 1983, **66**, 862-866

- MALLARD, B.A., DEKKERS, J.C., IRELAND, M.J., *et al.*  
Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health  
*J. Dairy Sci.*, 1998, **81**, 585-595
- MALLARD, B.A., LESLIE, K.E., DEKKERS, J.C.M., *et al.*  
Differences in bovine lymphocyte antigen associations between immune responsiveness and risk of disease following intramammary infection with *Staphylococcus aureus*  
*J. Dairy Sci.*, 1995, **78**, 1937-1944
- MALLARD, B.A., WAGTER, L.C., IRELAND, M.J., *et al.*  
Effects of growth hormone, insulin-like growth factor-I, and cortisol on periparturient antibody response profiles of dairy cattle  
*Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1997, **60**, 61-76
- MCGUIRE, T.C., MUSOKE, A.J., KURTTI, T.  
Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin  
*Immunology*, 1979, **38**, 249-256
- MORENO, C.R., LANTIER, F., BERTHON, P., *et al.*  
Genetic parameters for resistance to the *Salmonella abortusovis* vaccinal strain Rv6 in sheep  
*Genet. Sel. Evol.*, 2003, **35**, 199-217
- O'NEILL, R.G., WOOLLIAMS, J.A., GLASS, E.J., *et al.*  
Quantitative evaluation of genetic and environmental parameters determining antibody response induced by vaccination against bovine respiratory syncytial virus  
*Vaccine*, 2006, **24**, 4007-4016
- PINARD, M.-H., JANSS, L.L.G., MAATMAN, R., *et al.*  
Effect of divergent selection for immune responsiveness and of Major Histocompatibility Complex on resistance to Marek's disease in chickens  
*Poult. Sci.*, 1993, **72**, 391-402
- PINARD, M.-H., VAN ARENDONK, J.A.M., NIEUWLAND, M.G.B., *et al.*  
Divergent selection for immune responsiveness in chickens: estimation of realized heritability with an animal model  
*J. Anim. Sci.*, 1992, **70**, 2986-2993
- RAINARD, P.  
The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections  
*Vet. Res.*, 2003, **34**, 647-670
- RAINARD, P., RIOLLET, C.  
Innate immunity of the bovine mammary gland  
*Vet. Res.*, 2006, **37**, 369-400
- REYNOLDS, G.E., GRIFFIN, J.F.T.  
Antibody responses to bacterial antigens in the pregnant ewe  
*N. Z. Vet. J.*, 1986, **34**, 4-6

- REYNOLDS, G.E., GRIFFIN, J.F.T.  
Humoral immunity in the ewe  
2. The effect of pregnancy on the primary and secondary antibody response to protein antigen  
*Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1990, **25**, 155-166
- RIOLLET, C., RAINARD, P., POUTREL, B.  
Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland  
*Adv. Exp. Med. Biol.*, 2000, **480**, 247-258
- RUPP, R., BERGONIER, D., DION, S., *et al.*  
Response to SCS-based selection for mastitis resistance in a divergent selection experiment in sheep  
*J. Dairy Sci.*, sous presse
- SORDILLO, L.M., SHAFER-WEAVER, K., DeROSA, D.  
Immunobiology of the mammary gland  
*J. Dairy Sci.*, 1997, **80**, 1851-1865
- TAN, P.-L., JACOBSON, R.M., POLAND, G.A., *et al.*  
Twin studies of immunogenicity – determining the genetic contribution to vaccine failure  
*Vaccine*, 2001, **19**, 2434-2439
- TAO, W., CORBETT, M.J., PICKETT, W.  
Monomeric bovine IgG2 is a potent stimulus for bovine neutrophils  
*J. Leukoc. Biol.*, 1995, **58**, 203-208
- TEXEREAU, J., CHICHE, J.-D., TAYLOR, W., *et al.*  
The importance of Toll-Like Receptor 2 polymorphism in severe infections  
*Clin. Infect. Dis.*, 2005, **41 (suppl 7)**, 408-415
- VANGROENWEGHE, F., LAMOTE, I., BURVENICH, C.  
Physiology of the periparturient period and its relation to severity of clinical mastitis  
*Domest. Anim. Endocrinol.*, 2005, **29**, 283-293
- VIGAR, N.D., CABRERA, W.H.K., ARAUJO, L.M.M., *et al.*  
Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction  
*Eur. J. Immunol.*, 2000, **30**, 431-437
- WAGTER, L.C., MALLARD, B.A., WILKIE, B.N., *et al.*  
A quantitative approach to classifying Holstein cows based on antibody responsiveness and its relationship to peripartum mastitis occurrence  
*J. Dairy Sci.*, 2000, **83**, 488-498
- 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
- WILKIE, B., MALLARD, B.  
Selection for high immune response: an alternative approach to animal health maintenance ?  
*Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1999, **72**, 231-235

## ANNEXE 1 : Calendrier expérimental

**Tableau 4 : Récapitulatif du calendrier expérimental**

(OVA : ovalbumine ; CFA : adjuvant complet de Freund ; IFA : adjuvant incomplet de Freund ; SC : voie sous-cutanée ; Intra-mamm. : voie intra-mammaire)

Date	Injection (voie)	Echantillons analysés
13/10/06 J0	OVA + CFA (SC)	Sérum
27/10/06 J14	OVA + IFA (SC)	Sérum
10/11/06 J28		Sérum
01/02/07 J111	OVA (Intra-mamm.)	Sérum + Lactosérum
05/02/07 J115		Sérum + Lactosérum
08/02/07 J118		Sérum + Lactosérum
15/02/07 J125		Sérum + Lactosérum
21/05/07 J210	OVA + IFA (SC)	Sérum
29/05/07 J218		Sérum

## ANNEXE 2 : Effectifs des brebis

**Tableau 5 : Effectifs des brebis**

(Stade de gestation en jours ; N.C. : non communiqué)

Brebis N°	Lignée	Date de mise bas	Stade de gestation à l'immunisation	Date de mise à la traite	Stimulation intramammaire
4078	CCS-	17/12/2006	85	18/01/2007	NON
4084	CCS-	17/12/2006	85	18/01/2007	NON
4086	CCS+	26/11/2006	106	02/01/2007	OUI
4092	CCS-	29/11/2006	103	02/01/2007	OUI
4095	CCS-	20/12/2006	82	18/01/2007	NON
4127	CCS-	30/11/2006	102	02/01/2007	OUI
4136	CCS+	30/11/2006	102	02/01/2007	OUI
4172	CCS+	01/12/2006	101	N.C.	NON
4185	CCS-	02/12/2006	100	02/01/2007	OUI
4197	CCS-	30/11/2006	102	02/01/2007	OUI
4218	CCS-	19/12/2006	83	18/01/2007	NON
4232	CCS-	30/11/2006	102	02/01/2007	OUI
4250	CCS+	03/01/2007	68	N.C.	NON
4254	CCS+	01/12/2006	101	02/01/2007	OUI
4256	CCS-	17/12/2006	85	18/01/2007	NON
4281	CCS+	01/12/2006	101	02/01/2007	OUI
4294	CCS-	04/12/2006	98	02/01/2007	OUI
4295	CCS-	29/11/2006	103	02/01/2007	OUI
4337	CCS-	02/12/2006	100	09/01/2007	NON
4361	CCS+	27/11/2006	105	02/01/2007	OUI
4362	CCS+	29/11/2006	103	02/01/2007	OUI
4363	CCS+	18/12/2006	84	18/01/2007	NON
4382	CCS-	29/11/2006	103	02/01/2007	OUI
4393	CCS-	30/11/2006	102	02/01/2007	OUI
4406	CCS+	16/12/2006	86	18/01/2007	NON
4418	CCS+	<i>Non gestante</i>			NON
4420	CCS-	26/11/2006	106	09/01/2007	NON
4442	CCS+	<i>Non gestante</i>			NON
4449	CCS-	01/12/2006	101	02/01/2007	OUI
4464	CCS+	28/11/2006	104	02/01/2007	OUI
4465	CCS+	29/11/2006	103	02/01/2007	OUI
4467	CCS+	<i>Non gestante</i>			NON
4468	CCS+	03/12/2006	99	02/01/2007	OUI
4479	CCS-	02/12/2006	100	02/01/2007	OUI
4497	CCS+	02/12/2006	100	02/01/2007	OUI
4549	CCS+	01/12/2006	101	02/01/2007	OUI
4571	CCS-	04/12/2006	98	02/01/2007	OUI
4576	CCS-	<i>Non gestante</i>			NON
4584	CCS+	29/11/2006	103	N.C.	NON
4605	CCS-	04/12/2006	98	02/01/2007	OUI
4610	CCS+	18/12/2006	84	18/01/2007	NON
4616	CCS-	20/12/2006	82	18/01/2007	NON

## ANNEXE 3 : Protocole ELISA pour le dosage des IgG anti-ovalbumine

### **Etape 1 : fixation de l'ovalbumine en plaque ELISA**

Les plaques ELISA utilisées sont des plaques de micro-titration de 96 puits (BECTON DICKINSON-FALCON, réf. 353915). La solution d'ovalbumine (SIGMA, réf A5503), diluée au 1/1000 en tampon « carbonate-bicarbonate » (cf. infra), est distribuée à la pipette multicanaux à raison de 50 µl par puit. Une fois la distribution faite, la plaque est recouverte par un film autocollant et stockée à 4°C pendant une durée minimum de 12h.

#### Préparation du tampon « carbonate-bicarbonate »

*Dilution de 0,795g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (SIGMA, réf S6139) et de 1,465g de NaHCO<sub>3</sub> (MERCK, réf 106329) en quantité suffisante d'eau distillée pour un volume final de 500mL. Le pH final est de 9,6.*

### **Etape 2 : préparation des dilutions**

Les échantillons (sérum ou lactosérum) sont dilués en tampon « PBS-Tween 0,1%-BSA 1% » (cf. infra). On utilise pour les dilutions des plaques test de 96 puits (BECTON DICKINSON-FALCON, réf 353072). Le plan de plaque type utilisé est représenté au tableau 6.

La référence est donnée par le sérum standard dilué en série dans les deux premières colonnes : la solution distribuée en ligne A est diluée au 1/1000<sup>ème</sup>, puis à chaque changement de ligne on procède à une dilution au tiers de la ligne précédente. La solution la plus fortement diluée est distribuée en ligne G (1/729000<sup>ème</sup>). Le témoin négatif, appelé « blanc », est donné par les puits H1 et H2 qui contiennent uniquement le diluant (tampon « PBS-Tween 0,1%-BSA 1% »).

Chaque échantillon dont on veut mesurer le titre en anticorps est distribué dans deux colonnes et à quatre dilutions différentes. Les sérums sont dilués à 1/300, 1/900, 1/2700 et 1/8100, tandis que les lactosérums sont dilués à 1/50, 1/150, 1/450 et 1/1350.

**Tableau 6 : plan de plaque ELISA type**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	STANDARD	STANDARD	ECHANT.1		ECHANT.2		ECHANT.3		ECHANT.4		ECHANT.5	
C												
D												
E												
F												
G					ECHANT.6		ECHANT.7		ECHANT.8		ECHANT.9	
H	BLANC											

Préparation de la solution « PBS-Tween 0,1% »

Préparation de la solution de PBS (Phosphate-Buffered Saline) par dilution d'une pastille (INVITROGEN-GIBCO, réf 18912-014) dans 500ml d'eau distillée. Dilution d'1ml de solution Tween 20 (SIGMA, réf P7949) par litre de solution de PBS.

Préparation du tampon « PBS-Tween 0,1%-BSA 1% »

Dilution de BSA (Bovine Serum Albumine, SIGMA, réf A7030) à raison d'1g pour 100ml de solution « PBS-Tween 0,1% ».

**Etape 3 : distribution des échantillons dilués sur la plaque ELISA**

La plaque ELISA est préalablement lavée en laveur automatique (DYNATECH MRW). Celui-ci distribue 300µl de solution « PBS-Tween 0,1% » (cf. supra) par puit, les aspire, et répète ce cycle trois fois. Après avoir tamponné la plaque ELISA sur papier absorbant, on procède à la distribution des sérums dilués à l'aide d'une pipette multicanaux. La quantité distribuée est de 100 µl par puit. La plaque ELISA est ensuite placée pendant une heure à la température de 37°C.

**Etape 4 : distribution de l'anticorps secondaire**

L'anticorps secondaire utilisé est une solution polyclonale d'anticorps d'âne anti-IgG de mouton (DONKEY ANTI SHEEP/GOAT IgG, SEROTEC, réf STAR88P) ; il est utilisé à la dilution 1/7500 en tampon « PBS-Tween 0,1%-BSA 1% ».

Après avoir été vidée par retournement et tamponnée sur papier absorbant, la plaque ELISA est lavée suivant le protocole décrit plus haut. Puis la solution d'anticorps secondaire est distribuée à l'aide d'une pipette multicanaux à raison de 100µl par puit. La plaque ELISA est ensuite à nouveau placée à 37°C pendant une heure.

#### **Etape 5 : distribution du substrat coloré**

L'indicateur coloré utilisé est un substrat TMB (TetraMethylBenzidine, SIGMA-FLUKA, réf 87748) dilué à 1/20 en tampon « citrate » (cf. infra). La plaque ELISA est vidée et lavée suivant le même protocole que précédemment, avant de recevoir 100µl par puit de solution d'indicateur coloré.

La plaque est ensuite placée à l'obscurité et à température ambiante pendant une durée de 15 à 20 minutes. La réaction chimique entraîne l'apparition d'une coloration bleue.

#### Préparation du tampon « citrate »

*Dilution de 6,3g d'acide citrique (SIGMA-FLUKA, réf 27490) dans 800 ml d'eau distillée. Ajustement du pH à 4,1 par ajout de KOH puis du volume à 1L.*

#### **Etape 6 : arrêt de la réaction et mesure de la densité optique**

L'arrêt de la réaction est obtenu par la distribution de 100µl par puit de solution d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à la concentration d'1 mol/L. La solution obtenue dans les puits est de couleur jaune.

La mesure de la densité optique est réalisée au moyen d'un spectrophotomètre d'absorbance (VERSAMAX-MOLECULAR DEVICES), utilisé à deux longueurs d'onde, 450 et 600 nanomètres.

## ANNEXE 4 : Résultats bruts

**Tableau 7 : Résultats des dosages d'IgG anti-ovalbumine dans le sérum (UA/ml)**

(Stade G : nombre de jours de gestation à la première injection d'immunisation)

Brebis N°	CCS	Stade G	J0	J14	J28	J111	J115	J118	J125	J210	J218
4092	-	103	2160	84380	189186	628471	1230123	2207068	1230970	396653	885233
4127	-	102	300	5680	69668	70630	186125	146078	114705	15715	148705
4185	-	100	989	51760	347826	225626	791220	442923	518983		
4197	-	102	300	38274	124264	111755	208330	231430	248433	26520	254693
4232	-	102	680	53231	185776	275866	594788	571155	771408	153063	781563
4294	-	98	1025	185240	711314	1421929	2135163	2038700	4348703	287813	2939325
4295	-	103	1331	149333	877225	231015	282180	455588	722468	89488	357850
4382	-	103	493	129534	360061	538916	618033	645090	782738	175815	452055
4393	-	102	300	286992	1109515	641722	934838	972498	1207650	453163	2601128
4449	-	101	701	52397	200532	320408	352915	414038	353360	90035	430723
4479	-	100	530	36535	405107	440634	518910	583568	477930	44498	372190
4571	-	98	683	812226	1229093	690585	1001973	992633	822935	134183	1237788
4605	-	98	513	15159	125021	359929	591908	654430	557935	127610	377350
4078	-	85	4506	1022408	1896903					74095	473135
4084	-	85	1657	830790	5485851					88018	673575
4095	-	82	2385	558274	2167979					102423	381578
4218	-	83	1332	738000	3099088					114255	1304003
4256	-	85	2885	1995565	3697083					93465	1151188
4337	-	100	3203	591240	2771962						
4420	-	106	1900	53508	270308					64890	587788
4576	-		2426	923288	16459490					39330	126138
4616	-	82	1618	41523	381027						
4086	+	106	580	125609	570607	755984	1009740	902728	828038	235533	
4136	+	102	717	7820	47826	91134	173300	239420	312138	38493	216978
4254	+	101	300	29819	95569	157509	425178	369703	473965	51473	403660
4281	+	101	1687	48253	123872	352935	251843	338258	502593	142503	310973
4361	+	105	492	201100	732800	990145	743440	846750	750803	138718	574233
4362	+	103	503	14227	56730	417661	317700	312868	455170	69985	223498
4464	+	104	524	9626	67475	106638	104123	119510	99540	16570	75325
4465	+	103	300	68050	198771	574532	811018	717175	1362658	119078	6522550
4468	+	99	300	124900	824516	127421	200125	240203	397545	96270	158205
4497	+	100	677	116690	213314	160923	183898	174510	187298	89590	277233
4549	+	101	852	432398	884797	703233	402440	453603	382675		
4172	+	101	1020	117694	161009						
4250	+	68	2145	213581	1136857					46910	429063
4363	+	84	2389	61889	514500					10843	238590
4406	+	86	1246	175691	1418783					231408	868838
4418	+		2094	249758	322502					299558	2395560
4442	+		551	65854	322605						
4467	+		1173	99527	454196						
4584	+	103	300	46385	358072						
4610	+	84	1509	67926	355764					99168	488573

**Tableau 8 : Résultats des dosages d'IgG anti-ovalbumine dans le sérum après transformation logarithmique (log2(UA)/ml)**

(Stade G : nombre de jours de gestation à la première injection d'immunisation)

Brebis N°	CCS	Stade G	J0	J14	J28	J111	J115	J118	J125	J210	J218
4092	-	103	11,08	16,36	17,53	19,26	20,23	21,07	20,23	18,60	19,76
4127	-	102	8,23	12,47	16,09	16,11	17,51	17,16	16,81	13,94	17,18
4185	-	100	9,95	15,66	18,41	17,78	19,59	18,76	18,99		
4197	-	102	8,23	15,22	16,92	16,77	17,67	17,82	17,92	14,69	17,96
4232	-	102	9,41	15,70	17,50	18,07	19,18	19,12	19,56	17,22	19,58
4294	-	98	10,00	17,50	19,44	20,44	21,03	20,96	22,05	18,13	21,49
4295	-	103	10,38	17,19	19,74	17,82	18,11	18,80	19,46	16,45	18,45
4382	-	103	8,95	16,98	18,46	19,04	19,24	19,30	19,58	17,42	18,79
4393	-	102	8,23	18,13	20,08	19,29	19,83	19,89	20,20	18,79	21,31
4449	-	101	9,45	15,68	17,61	18,29	18,43	18,66	18,43	16,46	18,72
4479	-	100	9,05	15,16	18,63	18,75	18,99	19,15	18,87	15,44	18,51
4571	-	98	9,42	19,63	20,23	19,40	19,93	19,92	19,65	17,03	20,24
4605	-	98	9,00	13,89	16,93	18,46	19,18	19,32	19,09	16,96	18,53
4078	-	85	12,14	19,96	20,86					16,18	18,85
4084	-	85	10,69	19,66	22,39					16,43	19,36
4095	-	82	11,22	19,09	21,05					16,64	18,54
4218	-	83	10,38	19,49	21,56					16,80	20,31
4256	-	85	11,49	20,93	21,82					16,51	20,13
4337	-	100	11,65	19,17	21,40						
4420	-	106	10,89	15,71	18,04					15,99	19,16
4576	-		11,24	19,82	23,97					15,26	16,94
4616	-	82	10,66	15,34	18,54						
4086	+	106	9,18	16,94	19,12	19,53	19,95	19,78	19,66	17,85	
4136	+	102	9,49	12,93	15,55	16,48	17,40	17,87	18,25	15,23	17,73
4254	+	101	8,23	14,86	16,54	17,27	18,70	18,50	18,85	15,65	18,62
4281	+	101	10,72	15,56	16,92	18,43	17,94	18,37	18,94	17,12	18,25
4361	+	105	8,94	17,62	19,48	19,92	19,50	19,69	19,52	17,08	19,13
4362	+	103	8,97	13,80	15,79	18,67	18,28	18,26	18,80	16,09	17,77
4464	+	104	9,03	13,23	16,04	16,70	16,67	16,87	16,60	14,02	16,20
4465	+	103	8,23	16,05	17,60	19,13	19,63	19,45	20,38	16,86	22,64
4468	+	99	8,23	16,93	19,65	16,96	17,61	17,87	18,60	16,55	17,27
4497	+	100	9,40	16,83	17,70	17,30	17,49	17,41	17,51	16,45	18,08
4549	+	101	9,73	18,72	19,75	19,42	18,62	18,79	18,55		
4172	+	101	9,99	16,84	17,30						
4250	+	68	11,07	17,70	20,12					15,52	18,71
4363	+	84	11,22	15,92	18,97					13,40	17,86
4406	+	86	10,28	17,42	20,44					17,82	19,73
4418	+		11,03	17,93	18,30					18,19	21,19
4442	+		9,11	16,01	18,30						
4467	+		10,20	16,60	18,79						
4584	+	103	8,23	15,50	18,45						
4610	+	84	10,56	16,05	18,44					16,60	18,90

**Tableau 9 : Résultats des dosages d'IgG anti-ovalbumine dans le lactosérum**

Brebis N°	CCS	Résultats en UA/ml				Résultats après transformation logarithmique, en log <sub>2</sub> (UA)/ml			
		J111	J115	J118	J125	J111	J115	J118	J125
4092	-	3590	5470	5195	4507	11,81	12,42	12,34	12,14
4127	-	1292	1822	626	913	10,34	10,83	9,29	9,83
4185	-	1017	1187	1066	1845	9,99	10,21	10,06	10,85
4197	-	1832	2523	1326	2060	10,84	11,30	10,37	11,01
4232	-	2319	2824	4353	5068	11,18	11,46	12,09	12,31
4295	-	8663	6860	13878	9986	13,08	12,74	13,76	13,29
4382	-	2004	2743	2287	3332	10,97	11,42	11,16	11,70
4393	-	6260	13273	6699	17590	12,61	13,70	12,71	14,10
4449	-	2502	7625	2644	3105	11,29	12,90	11,37	11,60
4479	-	1972	3089	1555	1824	10,95	11,59	10,60	10,83
4571	-	7254	15275	9484	6910	12,82	13,90	13,21	12,75
4605	-	3009	3956	2738	2874	11,55	11,95	11,42	11,49
4086	+	4644	5490	4968	5240	12,18	12,42	12,28	12,36
4136	+	683	921	494	468	9,42	9,85	8,95	8,87
4254	+	1263	1761	1342	1572	10,30	10,78	10,39	10,62
4281	+	2428	19991	2732	4736	11,25	14,29	11,42	12,21
4361	+	1149	1934	679	1498	10,17	10,92	9,41	10,55
4362	+	1730	5347	2085	3103	10,76	12,38	11,03	11,60
4464	+	384	1042	625	664	8,58	10,03	9,29	9,37
4465	+	5806	11227	4805	4314	12,50	13,45	12,23	12,07
4468	+	3381	5300	6024	10143	11,72	12,37	12,56	13,31
4497	+	1502	2902	2844	3391	10,55	11,50	11,47	11,73
4549	+	3562	3897	2079	2559	11,80	11,93	11,02	11,32

Toulouse, 2009

NOM : MECHIN

Prénom : Pierre

**TITRE : ETUDE DE LA VARIABILITE DE LA PRODUCTION D'ANTICORPS APRES IMMUNISATION EN RELATION AVEC UNE SELECTION GENETIQUE SUR LA REPONSE INFLAMMATOIRE MAMMAIRE CHEZ LA BREBIS**

RESUME : L'étude compare la production d'anticorps entre des lignées de brebis issues d'une sélection divergente sur la concentration de cellules somatiques dans le lait. Les brebis ont été immunisées par injection d'ovalbumine en adjuvant de Freund. Durant la phase mémoire, un rappel antigénique intra-mammaire a été réalisé. La quantité d'immunoglobulines G spécifiques a été mesurée par ELISA dans le sérum et le lactosérum.

Il existe un effet significatif de la lignée CCS sur la production d'anticorps à la fois au cours de la réponse primaire et après stimulation intra-mammaire. Le stade de gestation module très significativement l'intensité de la réponse anticorps.

La question de la relation entre réponse anticorps et résistance aux mammites est discutée. La différence de réponse humorale entre les brebis des deux lignées peut être due à un déterminisme génétique commun aux deux réponses. Elle peut aussi s'expliquer par la contribution des anticorps à la lutte contre les infections mammaires.

MOTS-CLES : BREBIS – CCS – MAMMITE – ANTICORPS – GENETIQUE

---

**ENGLISH TITLE : VARIABILITY OF ANTIBODY PRODUCTION UPON IMMUNISATION IN RELATION WITH MILK SOMATIC CELL COUNT (SCC)-BASED GENETIC SELECTION IN THE EWE**

ABSTRACT : Antibody response was compared between two lines of dairy ewes issued from a divergent selection on milk somatic cell counts. Ewes were immunized with ovalbumin in Freund's adjuvant. An antigenic recall was performed intra-mammary during the memory phase. Specific immunoglobulin G levels were measured by ELISA in the serum and lactoserum.

There is a significant effect of SCC line on antibody production, both during the primary response, and later upon intra-mammary injection of soluble antigen. Gestation strongly influenced intensity of the antibody production.

The relation between antibody response and mastitis resistance is discussed. Intensity of the antigen-specific humoral response that is significantly different in the two lines, may be caused by a common genetic determinism for antibody production and mastitis resistance. Higher antibody response could also contribute to improved mammary defences.

KEYWORDS : EWE – SCC – MASTITIS – ANTIBODY – GENETICS