



**HAL**  
open science

# Effet d'une restriction alimentaire sur l'aptitude des vaches laitières à développer une réponse pro-inflammatoire

Élisa Arnaud

► **To cite this version:**

Élisa Arnaud. Effet d'une restriction alimentaire sur l'aptitude des vaches laitières à développer une réponse pro-inflammatoire. Sciences du Vivant [q-bio]. 2018. dumas-01950742

**HAL Id: dumas-01950742**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01950742>**

Submitted on 11 Dec 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Année universitaire : 2017 - 2018

Spécialité : Science et ingénierie en  
Productions animales

Spécialisation (et option éventuelle) : Non

## Mémoire de fin d'études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

# Effet d'une restriction alimentaire sur l'aptitude des vaches laitières à développer une réponse pro-inflammatoire.

Par : Elisa ARNAUD



**Soutenu à Agrocampus Ouest centre de Rennes le 10.09.18**

**Devant le jury composé de :**

Présidente : Vanessa Lollivier

Rapportrice : Catherine Disenhaus

Maître de stage : Marion Boutinaud, Jocelyne Flament

Enseignant référent : Pierre-Guy Marnet

*Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST*

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation

«Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France»

disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>





## Remerciements

Je tiens naturellement à remercier Marion Boutinaud et Jocelyne Flament pour leur encadrement, leurs conseils, le temps et la confiance accordés tout au long de ce stage. Ce stage aura été une expérience enrichissante tant sur le plan professionnel que personnel !

Je tiens à remercier Pierre Germon pour son accueil au sein de l'UMR ISP à Tours. Cette visite aura été rapide mais très intéressante et instructive.

Je tiens également à remercier Philippe Faverdin, pour ses conseils lors des quelques réunions nous ayant permis de discuter à propos du projet.

Merci à ceux/celles de site de Saint-Gilles, Le Rheu ou Rennes, qui ont élaboré ce projet et permis que je présente aujourd'hui ce travail : Sabrina Philau, Perrine Debournoux, Sandra Wiart, Maryvonne Texier, Clara Lambard, Joseph Onirel, David Sidaner, Mathieu Guilloux... et bien d'autres.

Merci pour votre gentillesse, votre bonne humeur à toute épreuve, que ce soit très tôt le matin lors de la période expérimentale, ou plus tard la journée, dans les labos. J'ai rencontré des personnes professionnelles et humaines avec qui ça a été un plaisir de travailler !

Je n'oublie pas, Maryline, Thibault, Nicole, Sophie, Catherine et les doctorants/ 'jeunes docteurs': Pierre, Clémence, David, Alice, Sophie, Cléo. Merci pour votre accueil sympathique et tous ces bons moments partagés tout au long de ce stage.

Enfin, je remercie Madame Florence Gondret, directrice de l'unité ainsi que l'ensemble du personnel de l'UMR PEGASE pour leur accueil au cours de ces 6 mois de stages.

Enfin je tiens à remercier mes parents et mes proches qui m'ont toujours soutenue dans ce que j'entreprenais. Ce travail est l'aboutissement de 5 belles années d'études et j'en suis arrivée là grâce à vous !

Encore merci à tous pour votre accueil et je vous souhaite une très bonne continuation !



## Table des matières

I.	Introduction .....	1
II.	Synthèse bibliographique.....	2
II.1.	Effet d'une restriction alimentaire sur les performances zootechniques de l'animal .....	2
II.1.1	Effet sur la quantité et la composition du lait produit.....	2
II.1.2.	Effet sur le nombre et l'activité des cellules épithéliales dans la glande mammaire .....	2
II.1.3.	Effet sur le statut nutritionnel et l'état de l'animal .....	3
II.2.	La réaction inflammatoire.....	3
II.2.1.	Initiation de la réponse inflammatoire .....	3
II.2.2.	L'haptoglobine, marqueur de l'inflammation .....	4
II.2.3.	Inflammation de la mamelle : la mammite .....	4
II.3.	Effet d'une restriction alimentaire sur la réponse inflammatoire .....	5
II.3.1.	Effet sur la concentration sérique en haptoglobine lors d'un challenge infectieux .....	5
II.3.2.	Effet sur les cytokines .....	5
II.4.	Conclusion et objectif de recherche .....	6
III.	Matériels et Méthodes .....	7
III.1.	Les animaux.....	7
III.2.	Schéma expérimental et traitement .....	7
III.3.	Mesures et analyses réalisées.....	8
III.3.1.	Données zootechniques.....	8
III.3.2.	Analyses réalisées à partir du lait.....	8
III.3.3.	Analyses réalisées à partir du sang .....	9
III.4.	Analyses statistiques .....	10
IV.	Résultats .....	12
IV.1.	La restriction alimentaire modifie les performances zootechniques et la composition du lait.....	12
IV.2.	La restriction alimentaire modifie le statut inflammatoire .....	12
IV.2.1.	Incubation du sang en présence de bactéries tuées.....	12
IV.2.2.	Incubation du sang en présence de CEM isolées à partir des cellules somatiques du lait .....	13
IV.3.	La restriction alimentaire modifie le statut métabolique .....	13
IV.4.	La restriction alimentaire est associée à des modifications de l'intégrité de l'épithélium mammaire ....	14
IV.5.	La parité modifie la réponse des vaches laitières face à la restriction alimentaire .....	14
V.	Discussion.....	15
V.1.	Réflexions sur le déroulement et les modèles de l'étude.....	15
V.2.	Effet de la restriction alimentaire .....	16
V.2.1.	Sur les paramètres zootechniques.....	16
V.2.2.	Sur la santé de la mamelle et l'intégrité de l'épithélium mammaire .....	17



V.2.3. Sur le statut inflammatoire .....	18
VI. Conclusion.....	20
Références Bibliographiques.....	21
Annexe 1 : Liste des animaux de l'essai 1804 (numéro, rang de lactation, date au vêlage).....	24
Annexe 2 : Protocole de purification des cellules épithéliales mammaires issues du lait .....	25
Annexe 3 : Photos des dispositifs de prélèvements sanguins et du matériel d'incubation .....	28
Annexe 4 : Tableaux complémentaires, effet de la semaine sur les paramètres zootechniques, cellulaires, inflammatoires et métaboliques.....	29



## Liste des figures

Figure 1 : Schéma expérimental de l'étude 1804. S-2, S-1, S+1, S+2 et S+5 correspondent aux semaines de prélèvements par rapport à la journée de transition alimentaire (J0). AGNE : Acide gras non estérifiés, b-OH :  $\beta$ -hydroxybutyrate, VL : vaches laitières.

Figure 2 : Schéma d'une plaque initiale servant à l'incubation des cellules épithéliales (CEM) mammaires de 18 vaches prélevées le jour jX d'une des 5 semaines d'expérimentation.

Figure 3 : Dispositif de prélèvement sanguin pour bovin adapté à des prises de sang à la veine jugulaire.

Figure 4 : Concentration en Interleukine 8 dans la plasma en ng/mL de vaches Prim Holstein (n=54) incubées avec une solution témoin, une solution contenant *Escherichia Coli* ou *Staphylococcus Aureus* tués en fonction de la semaine de prélèvement, -2 et -1 où les vaches sont alimentées avec un régime standard et 1,2 et 5 où elles sont alimentées avec un régime restreint (moyennes brutes  $\pm$  SEM).

Figure 5 : Concentration en Interleukine 8 en ng/mL dans le surnageant de culture de cellules épithéliales mammaires incubées avec une solution témoin, une solution contenant *Escherichia Coli* ou *Staphylococcus Aureus* tués en fonction de la semaine de prélèvement, -2 et -1 où les vaches sont alimentées avec un régime standard et 1, 2 et 5 où elles sont alimentées avec un régime restreint (moyenne brutes  $\pm$  SEM).

Figure 6 : Concentration en Interleukine 8 en ng/mL de vaches Prim Holstein (n=54) dans le surnageant de culture de cellules épithéliales mammaires en fonction de la parité des vaches (primipare/multipare) et du milieu d'incubation (solution témoin, solutions contenant *Escherichia Coli* ou *Staphylococcus Aureus* tués).



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Effets d'une restriction alimentaire sur la quantité et la composition du lait produit.

Tableau 2 : Concentration en haptoglobine dans le plasma sanguin en fonction du part et du statut inflammatoire des animaux.

Tableau 3 : Classements des pathogènes en lien avec les mammites chez la vache laitière en deux groupes (majeurs et mineurs) et caractérisation par catégorie, bactérie Gram positive (Gram +) ou Gram négative (Gram -), type de réservoir, et symptômes.

Tableau 4 : Description des aliments constituant la ration en fonction de leur pourcentage de matière sèche (MS), de leur unité de fourrage lait (UFL), de leur valeur en protéines digestibles par l'intestin permises par l'énergie (PDIE), de leur valeur en protéines digestibles par l'intestin permises par l'azote (PDIN), de leur teneur en calcium (Ca) et en phosphore (P).

Tableau 5 : Description des deux rations distribuées avant la transition alimentaire à J0 (phase 1) et après la transition (phase 2) en kilogrammes par jour.

Tableau 6 : Production laitière et composition du lait de vaches laitières Prim'Holstein (n=54) ayant été alimentées avec un régime standard pendant deux semaines suivies par un régime restreint pendant 5 semaines (moyenne  $\pm$  SEM).

Tableau 7 : Concentration en IL-8 dans le plasma ou dans le surnageant de culture de cellules épithéliales mammaires de vaches Prim'Holstein (n=54) en fonction du régime alimentaire (standard ou restreint) suivi par les animaux et du milieu d'incubation (solution témoin, solution contenant des bactéries tuées, *Escherichia Coli* ou *Staphylococcus Aureus*).

Tableau 8 : Concentration en métabolites plasmatiques de vaches laitières Prim'Holstein (n=54) ayant été alimentées avec un régime standard pendant deux semaines suivies par un régime restreint pendant 5 semaines (moyenne  $\pm$  SEM).

Tableau 9 : Concentration en lactose, sodium et potassium dans le lait de vaches laitières Prim'Holstein (n=54) ayant été alimentées avec un régime standard pendant deux semaines suivies par un régime restreint pendant 5 semaines (moyenne  $\pm$  SEM).

Tableau 10 : Production laitière, composition du lait et données zootechniques de vaches laitières Prim'Holstein (n=54) primipares ou multipares (moyenne  $\pm$  SEM).

Tableau 11 : Concentration en lactose dans le plasma, sodium et potassium dans le lait de vaches laitières Prim'Holstein (n=54) primipares ou multipares (moyenne  $\pm$  SEM).



## Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AGNE : Acides Gras Non Estérifiés

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

$\beta$ -OH :  $\beta$ -hydroxybutyrate

CSN $\beta$  : kappa-caséine

CCS : Comptage de Cellules Somatiques

CEM : Cellules Epithéliales Mammaires

SCS : Score en Cellules Somatiques

IL-1  $\beta$  : Interleukine 1  $\beta$

IL-2 : Interleukine 2

IL-6 : Interleukine 6

IL-8 : Interleukine 8

JDL : Jours De Lactation

JDS : Journal of Dairy Science

LALBA :  $\alpha$ -lactalbumine

LPS : LipoPolySaccharide

MS : Matière Sèche

MSI : Matière Sèche Ingérée

MG : Matières Grasses

MP : Matières Protéiques

PL : Production Laitière

TB : Taux Butyreux

TNF- $\alpha$  : Facteur de Nécrose Tumorale

TP : Taux Protéique



## I. Introduction

La durabilité des élevages laitiers dépend de la capacité d'adaptation des vaches laitières et de leur capacité à pouvoir réaliser des compromis entre les fonctions de lactation, reproduction et santé. Au cours de ces dernières décennies, la production de lait a considérablement augmenté en lien avec la croissance de la demande mondiale des consommateurs. L'augmentation de production a été possible grâce à la sélection génétique via l'accroissement de la productivité des vaches, mais a entraîné l'apparition d'animaux qui se sont révélés être plus à risque, ayant des problèmes comportementaux, physiologiques ou immunologiques (Rauw and Gomez-Raya, 2015). Ainsi, chez les vaches laitières, celle-ci a entraîné des difficultés de reproduction avec une baisse de la fertilité et de l'expression des chaleurs, posant de façon cruciale la question des compromis entre lactation, reproduction et santé. La durabilité des exploitations dépend aussi de la maîtrise des coûts de production. Face aux fluctuations des prix des intrants et du lait, des questions se posent sur l'adaptation des systèmes d'exploitation et notamment sur l'adaptation de l'alimentation qui est le premier poste de charges en élevage laitier (70 à 80% du coût opérationnel de l'atelier lait, selon Fischer, 2017). Les coûts élevés des concentrés font ressortir la nécessité d'alléger la part des « coûts de concentrés » dans la ration et d'optimiser au maximum les fourrages produits sur l'exploitation. Il s'agit aussi d'accepter d'éventuelles périodes de sous-alimentation notamment dans les systèmes à bas-intrants en cas de sécheresse. Or l'alimentation est un des principaux facteurs d'élevage affectant la production laitière et le métabolisme de la glande mammaire. La restriction alimentaire est connue pour engendrer une diminution de la production laitière et des changements physiologiques chez les vaches laitières (Guinard-Flament *et al.*, 2006, Gross *et al.*, 2011). La sévérité et la durée du déficit énergétique causé par la restriction sont reflétées par l'évolution de la production laitière, le degré d'élévation des concentrations en acides gras non estérifiés (AGNE) et  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $\beta$ -OH) et la diminution en glucose (Drackley, 1999, Moyes *et al.*, 2009). Or, ces métabolites sont la principale source d'énergie des cellules immunitaires. La restriction alimentaire jouerait donc aussi un rôle crucial dans la capacité de l'organisme à développer une réponse immunitaire.

L'objectif de l'étude était d'examiner l'impact d'une restriction énergétique sur la capacité de la vache laitière à développer une réaction pro-inflammatoire et sur quelques descripteurs de l'état sanitaire des animaux. Il s'agissait de tester la réponse immunitaire potentielle des cellules sanguines et des cellules épithéliales mammaires (CEM) lors de challenges infectieux (cellules incubées *in vitro* en présence de bactéries tuées). Cette restriction est réalisée à mi-lactation et non en début de lactation afin d'étudier l'effet propre du déficit énergétique et de s'affranchir des changements physiologiques liés à la période péripartum.

Une synthèse bibliographique présente les effets d'un changement de régime alimentaire sur les performances zootechniques et la physiologie des vaches laitières, puis sont respectivement présentés les matériels et méthodes, les résultats et une discussion autour de la problématique : Quel est l'impact de l'alimentation sur la réponse immunitaire potentielle des vaches laitières face à un challenge inflammatoire bactérien *in-vitro* ?

Tableau 1 : Effets d'une restriction alimentaire sur la quantité et la composition du lait produit

Auteurs	Régimes alimentaires	Animaux	Parité	Stade lactation	Ingestion de Matière sèche	Production laitière	Composition du lait
<b>Friggens et al. 1998</b>	Ensilage d'herbe avec : <b>Haut :</b> 300 g de concentré par Kg d'aliment <b>Bas :</b> 100 g de concentré par Kg d'aliment	24 Holsteins x Fresians  2 régimes haut et bas en énergie  Croisements régimes 2 x 2	Multipares de 2 <sup>ème</sup> à 8 <sup>ème</sup> lactation	153 <sup>ème</sup> jour de lactation (changement de régime)	Régime haut : 21,2 – 24,2 kg/j  Bas : 17,1 – 17,8 kg/j	- 5 à 10 kg lait /j  Haut : 36 kg à 25,8 kg/j  Bas : 25 kg à 21 kg/j	<b>Taux protéique (TP)</b> Haut : 31.6 – 32.8 g/ kg Bas : 29.9- 31.7 g/ kg  <b>Taux butyreux (TB)</b> Haut : 39.4 -39.8 g/ kg Bas : 42.2 -43.5 g/ kg
<b>Dessaige et al. 2011</b>	<b>Basal :</b> 55% ensilage de maïs, 15% luzerne déshydratée, 30% de concentré <b>Restreint :</b> 60% ensilage d'herbe, 40% foin	16 Holsteins x Normandes  (2 groupes selon alimentation : basal, restreint)	2 <sup>ème</sup> et 3 <sup>ème</sup> lactation	2 semaines avant vêlage à 11 semaines postpartum	\	Basal : 33, 5 kg/j  Restreint : 20,5 kg/j	<b>TP</b> Basal: 29.9 g/ kg Restreint: 26.7 g/ kg  <b>TB</b> Basal: 42.4 g/ kg Restreint: 42.3 g/ kg
<b>Gross et al. 2011</b>	<b>Contrôle :</b> régime haut en énergie (concentré, ensilage d'herbe et de maïs, concentrés) <b>Restreint :</b> dilution avec du foin, max concentré de 0,4 kg de MS/j	50 Holsteins  P1 : 1 à 12 sem de régime contrôle P2 : Puis 2 groupes (25 animaux) contrôle et restreint	Multipares 3.2 ± 0.2 lactations	1 semaine avant vêlage à 26 semaines postpartum  Période de restriction à 98 ± 7 jours de lactation	P1 : 16 kg / j	Contrôle : 30.5 ± 0.7 kg/ j  Restreint : 27.4 ± 0.5 kg/ j	<b>TP</b> C :33.7 ± 0.72 g/ kg R :31.7 ± 0.43 g/ kg  <b>TB</b> C :43.8 ± 0.95 g/ kg R :44,20 ± 0.80 g/ kg
<b>Abdelatty et al 2017</b>	<b>Contrôle :</b> ad libitum (65% fourrages : luzerne ensilage de maïs, 35% concentrés) <b>Restreint :</b> Nourries à 60 de leur IMS ad libitum	10 Holsteins - 14 j de régime contrôle, puis 2 groupes (5 animaux) Contrôle et Restreint	Multipares	4 jours de restriction à 101 ± 17 jours de lactation	Contrôle : 24.8 kg/j  Restreint : 15.2 kg/j	Contrôle : 41.2 ± 0.98 kg/j  Restreint : 33.0 ± 0.98 kg/j	<b>TP</b> Contrôle : 28.8 ± 0.67 g/ kg Restreint : 27.5 ± 0.84 g/ kg  <b>TB</b> Contrôle : 33.8 ± 1.32 g/ kg Restreint : 36.7 ± 1,65 g/ kg

## II. Synthèse bibliographique

### II.1. Effet d'une restriction alimentaire sur les performances zootechniques de l'animal

#### II.1.1 Effet sur la quantité et la composition du lait produit

La quantité et la composition du lait produit varient en fonction des apports énergétiques et protéiques journaliers. Chez la vache laitière, le volume de lait et la synthèse de lactose augmentent à la fois lorsque l'apport d'énergie croît et lorsque l'apport de protéines croît (Coulon and Remond, 1991). La restriction alimentaire est associée à une diminution conjointe du niveau d'énergie et de protéines apportés par la ration. Elle provoque une diminution de la production laitière (PL) qui dépend de sa durée et de son intensité. Une restriction sévère de 40%, réalisée sur une courte période (vaches laitières nourries à 60% de leur ingestion ad libitum durant 4 jours), a entraîné une diminution de 20 % de la production laitière en milieu de lactation (Abdelatty et al., 2017). Une restriction modérée de 20%, réalisée sur une période plus longue (vaches alimentées à hauteur de 80% de l'énergie et des protéines digestibles dans le petit intestin, de 2 semaines prepartum à 11 semaine postpartum), a entraîné une diminution de la production de lait de 38% (Dessaige et al., 2011). La restriction alimentaire provoque aussi une diminution du taux protéique (TP) et de la concentration en lactose dans le lait (Friggens *et al.*, 1998, Dessaige *et al.*, 2011, Gross *et al.*, 2011) (Tableau1).

#### II.1.2. Effet sur le nombre et l'activité des cellules épithéliales dans la glande mammaire

Des expériences réalisées chez la brebis et la vache laitière ont montré qu'une restriction alimentaire entraînait une diminution du nombre de cellules épithéliales mammaires (CEM), qui sont les cellules qui produisent du lait, dans la glande mammaire (Colitti *et al.*, 2005, Dessaige *et al.*, 2011). La quantité totale d'ADN dans la glande mammaire a été réduite de 20% chez les vaches restreintes par rapport aux vaches témoins (Dessaige et al., 2011). Les alvéoles mammaires étaient de plus petite taille et le taux de cellules apoptotiques était plus important chez les vaches soumises à une restriction (Dessaige et al., 2011).

L'activité des CEM, étudiée par le biais des CEM exfoliées dans le lait, est aussi modifiée (Boutinaud et al., 2015). Soumettre des vaches à une restriction alimentaire a des conséquences sur le taux d'expression de certains gènes impliqués dans la synthèse des différents constituants du lait. Plusieurs études montrent une diminution significative du taux d'ARNm du transporteur du glucose SLC2A1 analysé dans les CEM exfoliées du lait, suggérant donc une diminution du transport du glucose du compartiment sanguin vers les CEM (Boutinaud *et al.*, 2008, Sigl *et al.*, 2014). L'expression des gènes codant pour la kappa-caséine (CSN $\beta$ ) et l' $\alpha$ -lactalbumine (LALBA), deux protéines présentes dans le lait, augmente lors d'une restriction alimentaire sur courte période (70% de l'énergie ingérée ad libitum durant 4 jours) en début de lactation (Sigl et al., 2014). Elle ne varie pas lorsque la restriction est appliquée en milieu de lactation. Mais l'expression de ces gènes diminue



dans le tissu mammaire de la vache laitière lors d'une restriction longue réalisée dès le début de la lactation (Dessaige et al., 2011).

### II.1.3. Effet sur le statut nutritionnel et l'état de l'animal

Plusieurs études ont montré une diminution des concentrations plasmatiques en glucose et en insuline en réponse à une restriction alimentaire (Guinard-Flament *et al.*, 2006, Bjerre-Harpoth *et al.*, 2012). Les tissus adipeux et musculaires sont mobilisés, entraînant une libération dans le sang d'acides gras non estérifiés (AGNE), de  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $\beta$ -OH) et de triglycérides (Bjerre-Harpoth *et al.*, 2012, Gross *et al.*, 2013, Keogh *et al.*, 2015). La réponse métabolique face à la restriction dépend de sa durée, de sa sévérité et de sa période d'occurrence au cours du cycle de lactation. Une restriction de 30%, sur une période longue (vaches alimentées à 70% de leur besoin en énergie durant 3 semaines à  $98 \pm 7$  jours de lactation, JDL) a entraîné une augmentation des AGNE de 43% chez les vaches restreintes par rapport aux vaches nourries ad libitum (respectivement  $0.19 \pm 0.03$  mmol/L vs  $0.11 \pm 0.02$  mmol/L) (Gross et al., 2013). Aucune augmentation significative de  $\beta$ -OH a été observée (Gross et al., 2013). Une restriction sévère, en début de lactation (60% de la ration à base de paille durant 4 jours à  $42 \pm 2$  JDL) a entraîné une diminution de 17% de la concentration plasmatique en glucose, une augmentation de 20% de la concentration en AGNE et de 70% de la concentration en  $\beta$ -OH (Bjerre-Harpoth et al., 2012). Une restriction identique (60% de paille dans la ration, 4 jours) appliquée en milieu ou fin de lactation ( $159 \pm 39$  ou  $273 \pm 3$  JDL) a entraîné une diminution de 10% de la concentration plasmatique en glucose, une augmentation de 40% de la concentration en AGNE, et n'a pas eu d'incidence sur la concentration en  $\beta$ -OH (Bjerre-Harpoth et al., 2012). La réponse métabolique face à la restriction varie en fonction du stade de lactation, de l'état corporel des animaux, du niveau initial de la production laitière et de la variation de la production de lait. Les animaux vont s'adapter à la restriction via la chute de lait et la mobilisation. S'ils font chuter très fortement leur production de lait, alors ils auront peu ou pas à mobiliser leurs réserves corporelles. Par ailleurs, c'est un phénomène en dynamique : au début de la restriction, les animaux mobilisent leurs réserves puis ils adaptent leur niveau de production en fonction des apports alimentaires.

## II.2. La réaction inflammatoire

### II.2.1. Initiation de la réponse inflammatoire

La réaction inflammatoire est la réponse de l'animal hôte face à un trouble de son homéostasie contre toute lésion tissulaire et/ou cellulaire pouvant être de nature infectieuse, traumatique, immunologique, néoplasique ou autre (Gruys et al., 2005). Lors de l'initiation d'une réaction inflammatoire, la mort cellulaire, en lien ou non avec une infection, s'accompagne de la présence de signaux de danger dans le milieu extracellulaire. Des cellules du système immunitaire, tels que les macrophages, vont détecter ces signaux et sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ) mais également des chimiokines

Tableau 2 : Concentration en haptoglobine dans le plasma sanguin en fonction du part et du statut inflammatoire des animaux (Humblet et al, 2005).

Période autour du part (Jours)	Haptoglobine (mg/L)		
	Vaches saines	Inflammation modérée	Forte inflammation
-60 à 0	<30	30-100	>100
1 à 7	<150	>150	/
> 7	<30	30-100	>100

Tableau 3 : Classements des pathogènes en lien avec les mammites chez la vache laitière en deux groupes (majeurs et mineurs) et caractérisation par catégorie, bactérie Gram positive (Gram +) ou Gram négative (Gram -), type de réservoir, et symptômes (Villard, 2017).

Type pathogène	Nom pathogène	Catégorie	Type de réservoir	Symptômes
<b>Majeurs</b>	<i>Escherichia Coli</i>	Gram « - »	Environnemental	Cliniques aiguës ou suraiguës
	<i>Streptococcus Ubéris</i>	Gram « + »	Environnemental	Cliniques aiguës puis chroniques
	<i>Staphylococcus Aureus</i>	Gram « + »	Mammaire	Cliniques
<b>Mineurs</b>	<i>Staphylococcus à coagulase négative</i>	Gram « + »	Environnemental et mammaire	Subcliniques (parfois chroniques, quelques cas cliniques bénins)
	<i>Corynebacterium bovis</i>	Gram « + »	Mammaire	Subcliniques

comme l'interleukine 8 (IL-8). Les chimiokines sont des cytokines chimio-attractantes. Elles sont essentielles lors de cette phase précoce de l'inflammation car leur fonction principale est le recrutement des cellules leucocytaires vers le site lésé (Russo *et al.*, 2014, Turner *et al.*, 2014).

## II.2.2. L'haptoglobine, marqueur de l'inflammation

L'haptoglobine est synthétisée principalement par les hépatocytes. Il a été montré que la vache en bonne santé présente des taux de base d'haptoglobine très bas, voir indétectables (<10 mg/mL). L'augmentation de sa concentration sérique est souvent corrélée à la sévérité de l'inflammation. Elle peut augmenter dans le cas de l'inflammation de différents organes comme l'utérus, le tractus digestif, la mamelle, induite par exemple par le vêlage. C'est pour cette raison qu'elle est physiologiquement plus élevée la semaine suivant le vêlage (Humblet, 2005, Humblet *et al.*, 2006) (Tableau 2). Cette protéine est considérée comme un excellent marqueur de l'inflammation aigüe chez les mammifères et notamment le bovin.

## II.2.3. Inflammation de la mamelle : la mammite

### II.2.3.1. Définition et agents pathogènes responsables

Une **mammite** désigne une inflammation d'un ou plusieurs quartiers de la mamelle due principalement à une infection d'origine bactérienne. Il existe des cas de mammites « aseptiques ». Ce sont des mammites provoquées par des traumatismes locaux (Noireterre, 2006)

Une mammite est dite **clinique** lorsqu'elle engendre des modifications des sécrétions lactées produites par la glande mammaire (présence de grumeaux, plus aqueuses, traces de sang) ainsi que des signes d'inflammation plus ou moins marqués (rougeur, chaleur, enflure). Elle est considérée comme **aigüe ou suraigüe** lorsque les symptômes disparaissent rapidement, et **chronique** lorsque son apparition est récurrente. Une mammite clinique peut être qualifiée de bénigne si elle n'engendre pas d'inflammation, de modérée lorsque les sécrétions lactées sont modifiées et que le pis est inflammé et de sévère lorsque l'inflammation se généralise (fièvre... etc). Une mammite est dite **subclinique** lorsqu'elle n'engendre pas de changement macroscopique du lait. Elle se manifeste par un comptage de cellules somatiques (CCS) élevé (supérieur à 200 000/mL de lait). Les mammites peuvent être classées selon 1) qu'elles proviennent de l'environnement (sol, litières...), elles sont alors dites « à **réservoir environnemental** » ou 2) qu'elles se transmettent d'animal en animal principalement pendant la traite, elles sont alors qualifiées de mammites « à **réservoir mammaire** » (Descôteaux, 2004).

Les agents pathogènes responsables des mammites peuvent être divisés en deux groupes, les agents pathogènes majeurs et les agents pathogènes mineurs (tableau 3). *Escherichia coli* et *Staphylococcus Aureus* sont deux agents pathogènes majeurs responsables de mammites cliniques chez les vaches laitières. Les mammites engendrent une réduction de la production laitière et leur traitement peut



amener à une utilisation excessive d'antibiotiques (Villard, 2017). Elles ont donc un coût non-négligeable en élevage laitier. Il apparaît intéressant d'étudier les réactions de défenses immunitaires des animaux face à ces bactéries en vue de sélectionner des individus capables de lutter efficacement.

#### *II.2.3.2. Rôle des CEM lors d'une réaction inflammatoire déclenchée par des pathogènes responsables des mammites*

Les CEM représentent la population cellulaire la plus importante dans la glande mammaire saine et jouent un rôle clé dans le recrutement de cellules immunitaires lors des premiers stades d'infection. Une corrélation positive entre la synthèse de cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-8) par les CEM et la présence de particules d'E. Coli a été démontrée in-vivo (Bannerman, 2009). Des études montrent une augmentation significative d'ARNm codant pour CXCL8 (IL-8) dans le tissu mammaire et de la protéine CXCL8 dans le lait lors d'une infection par des pathogènes responsables des mammites. Les CEM sont sensibles à la présence d'E. Coli et ajustent l'expression de cytokines en fonction de la concentration en E. Coli dans le tissu mammaire (Bannerman, 2009, Gunther *et al.*, 2010, Schukken *et al.*, 2011). L'IL-8 est impliquée dans le recrutement des granulocytes neutrophiles. Il a été montré que le gène codant pour CXCL8 est un des premiers gènes exprimés dans le tissu mammaire après un stimulus infectieux in vivo (Schukken et al, 2011).

### II.3. Effet d'une restriction alimentaire sur la réponse inflammatoire

Peu d'articles publiés dans des journaux scientifiques relatent l'effet d'une restriction alimentaire sur la réponse inflammatoire. Etant donné le peu de références chez le bovin, cette partie bibliographique sera consacrée à plusieurs espèces.

#### II.3.1. Effet sur la concentration sérique en haptoglobine lors d'un challenge infectieux

Une étude montre que, lors d'une infection mammaire expérimentale avec *S. Ubéris*, des vaches en déficit énergétique ont des concentrations en haptoglobine plasmatique jusqu'à deux fois plus importantes que des vaches ayant un équilibre énergétique positif (respectivement 0.1 ng/mL et 0.2 ng/mL 20h après le lancement du challenge inflammatoire). Une production plus importante d'haptoglobine par le foie est donc une réponse de l'organisme afin de combattre les pathogènes (Moyes et al., 2009).

#### II.3.2. Effet sur les cytokines

Chez les lapins, la restriction alimentaire sur une période longue (nourris à hauteur de 75% de la quantité d'aliment ingérée ad libitum durant 28 jours, du sevrage à 68 jours d'âge) a entraîné une augmentation de l'expression des ARNm codant pour les cytokines IL-1 $\beta$  et IL-2 (respectivement



+30% et + 77% par rapport à une alimentation standard). La restriction a entraîné une diminution de l'expression de TNF- $\alpha$ . Elle n'a pas affecté la production d'IL-8 dans le plasma (Knudsen et al., 2015).

Chez l'homme, l'induction d'une hypoglycémie par injection d'insuline a provoqué une augmentation de la concentration en cytokines pro-inflammatoires dans le sang. L'injection d'insuline a induit une augmentation de TNF- $\alpha$  de 25%. La concentration a atteint un pic 45 min après injection. L'IL-8 a augmenté de 45% et a atteint un pic 60 min après injection. L'IL-6 a augmenté de 45% et a atteint un pic 120 min après injection. L'IL-1 $\beta$  a augmenté de 48% et a atteint un pic 240 min après injection (Razavi Nematollahi et al., 2009).

Chez la vache laitière (race Prim'Holstein, primipares, n=24), l'inoculation d'endotoxines (100  $\mu$ g de toxines issues de la membrane de bactéries) dans un quartier de la mamelle après 2 semaines d'alimentation ad libitum (n=12) ou de restriction alimentaire (apport de 80% des besoins en énergie, n=12) a entraîné une augmentation de la concentration en TNF- $\alpha$  dans le lait de 16% chez les animaux restreints par rapport aux animaux nourris ad libitum (respectivement 2,7 et 3,2 ng/mL 6h après inoculation). Par contre, aucun changement significatif de la concentration en TNF- $\alpha$  n'a été observé dans le sang (Perkins et al., 2002). Chez des vaches multipares (Race Prim'Holstein, n=10) en milieu de lactation (77 jours de lactation), l'inoculation de *S. Ubéris* dans un quartier de la mamelle après 5 jours d'alimentation ad libitum (n=5) ou de restriction (n=5) n'a pas eu d'effet sur les concentrations en TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  dans le lait mesurées 20 h après inoculation (Moyes et al., 2009).

#### II.4. Conclusion et objectif de recherche

L'hypothèse selon laquelle une restriction alimentaire modifie la capacité de l'organisme à déclencher une réponse inflammatoire est posée. Néanmoins, les études sont encore peu nombreuses. Elles suggèrent que la restriction alimentaire pourrait modifier le niveau d'inflammation à l'échelle de l'organisme et/ou son aptitude à répondre à un challenge infectieux, notamment au niveau de la mamelle. Les CEM ont la capacité de répondre face à l'invasion d'un pathogène. Elles pourraient jouer un rôle crucial lors de l'initiation d'une réponse inflammatoire au niveau de la mamelle. Néanmoins cette réponse n'a pas été étudiée dans le cadre d'une restriction alimentaire.

Aussi l'objectif de cette étude est de comparer la réponse des cellules immunitaires du sang et des CEM isolées à partir du lait face à l'introduction d'un agent pathogène dans le milieu chez des animaux nourris à hauteur de leurs besoins nutritionnels puis soumis à une restriction alimentaire. Il s'agit de savoir si la restriction alimentaire modifie cette réponse immunitaire (mesurée par la production d'IL8) et si cette réponse varie selon la nature des cellules (cellules immunitaires sanguines versus CEM). Pour réaliser cette comparaison, le challenge infectieux a été réalisé in vitro en incubant les cellules isolées (lait) ou non (sang) en présence de différentes bactéries tuées. Au cours de cet essai, des mesures ont aussi permis de caractériser les performances zootechniques des animaux (production et composition du lait), leur statut nutritionnel (mesure des métabolites sanguins : AGNE, glucose, b-OH, urée), leur statut inflammatoire systémique (haptoglobine sanguine) et mammaire (comptage des cellules somatiques du lait : CCS) et l'intégrité de l'épithélium mammaire (Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> dans le lait et lactose sanguin).

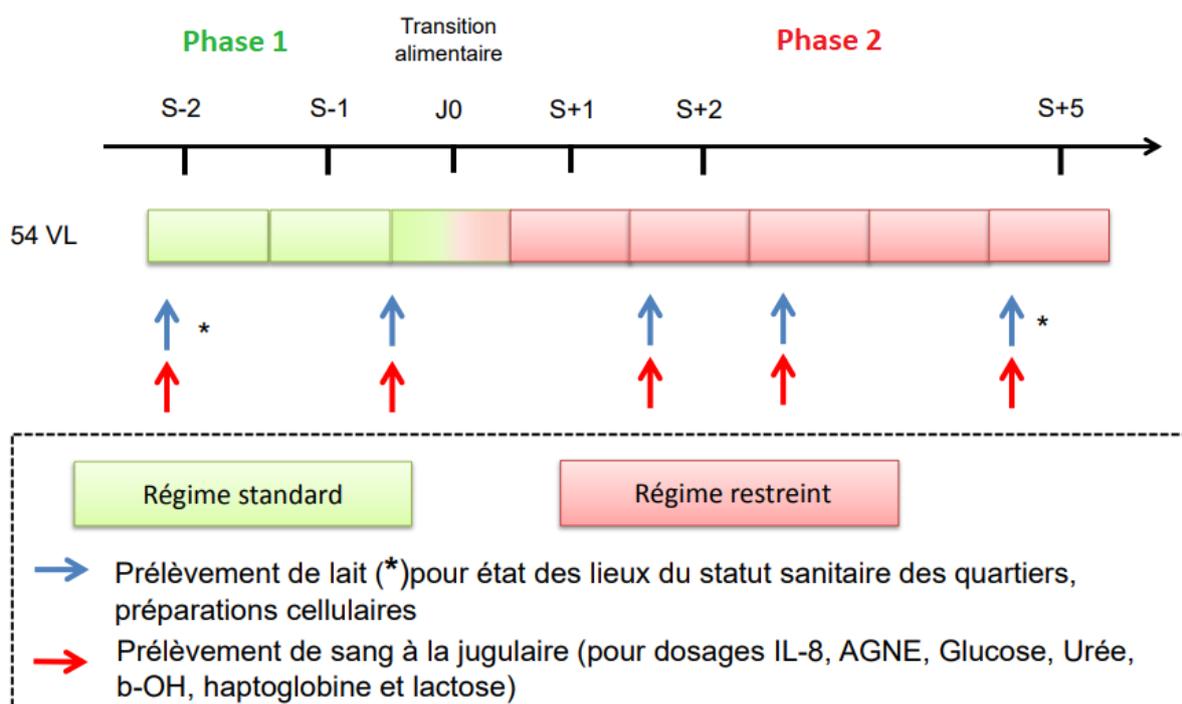


Figure 1 : Schéma expérimental de l'essai 1804. S-2, S-1, S+1, S+2 et S+5 correspondent aux semaines de prélèvements par rapport à la journée de transition alimentaire (J0). AGNE : Acide gras non estérifiés, b-OH :  $\beta$ -hydroxybutyrate, VL : vaches laitières.

Tableau 4 : Description des aliments constituant la ration en fonction de leur pourcentage de matière sèche (MS), de leur unité de fourrage lait (UFL), de leur valeur en protéines digestibles par l'intestin permises par l'énergie (PDIE), de leur valeur en protéines digestibles par l'intestin permises par l'azote (PDIN), de leur teneur en calcium (Ca) et en phosphore (P).

Aliment	Ensilage de Maïs	Concentré Energétique sans CMV	Tourteau de soja	Luzerne déshydratée	Paille	CMV 6/24/4
% MS	35.0	88.2	88.2	90.8	86.1	100
UFL (/kg MS)	0.89	1.09	1.2	0.68	0.42	0
PDIE (g/kg MS)	65	97	255	100	44	0
PDIN (g/kg MS)	37	77	367	114	22	0
Ca (g/kgMS)	1.6	3.74	3.6	22	2	240
P (g/kg MS)	1.4	3.81	6.8	3	1	60

Tableau 5 : Proportion des aliments dans les rations distribuées en période Témoin puis pendant la période de restriction alimentaire (en kg de Matière Brute par jour).

	Phase 1 : Période témoin	Phase 2 : Période de restriction alimentaire
Ensilage de maïs	65	60
Luzerne déshydratée	8	14
Tourteau de soja (48 ou 50)	18	13
Paille	0	11.5
CMV 6/24/4	0	1.5
Concentré énergétique	9	0.5

### III. Matériels et Méthodes

L'expérimentation s'est déroulée à l'Installation Expérimentale de Production Laitière (IEPL, UMR PEGASE) de Méjusseume (Le Rheu, Ille et Vilaine). Les échantillons ont été traités sur place ou au laboratoire de l'UMR PEGASE situé à Saint-Gilles puis analysés soit à St-Gilles, soit à l'UMR ISP à Tours. L'expérimentation a été réalisée sur les animaux de l'essai, déjà en cours, du projet ANR « DEFFILAIT » validé par le comité éthique.

#### III.1. Les animaux

L'expérimentation comprenait 54 vaches laitières de race Prim'Holstein (annexe 1) dont 29 vaches primipares ( $620.4 \pm 11.78$  kg de poids vif (PV) ;  $31.9 \pm 1.51$  kg de lait par jour au début de l'essai,  $201 \pm 10$  JDL) et 25 vaches multipares (rang de lactation moyen de 3.16,  $690.4 \pm 11.78$  kg de PV et  $32.6 \pm 1.29$  kg de lait par jour au début de l'essai,  $201 \pm 10$  JDL). Pour pouvoir réaliser l'ensemble des prélèvements et des mesures, les animaux ont été répartis en 3 séries (série 1, 2 et 3) de 18 animaux chacune et les prélèvements/mesures décalés d'un jour entre les séries. Pendant toute la durée de l'expérimentation, les animaux ont été traités 2 fois par jour, à 6h30 et 16h30, et recevaient deux repas par jour, distribués ad libitum, dans des cases individuelles afin de déterminer les quantités individuelles de matière sèche ingérée (données non disponibles lors de ce stage et donc non valorisées).

#### III.2. Schéma expérimental et traitement

L'essai a duré 8 semaines (du 5 mars au 25 avril 2018). Il s'est déroulé selon un schéma en continu avec deux périodes, la première de 2 semaines (période témoin : S-2 et S-1) et la deuxième de 6 semaines (période de restriction alimentaire : S0, S+1, S+2, S+3, S+4, S+5) où S0 était la semaine de transition alimentaire (Figure 1). En période témoin, les animaux recevaient une ration à base d'ensilage de maïs (65% de la ration) destinée à couvrir les besoins énergétiques et azotés des animaux (Tableaux 4 et 5). Pendant la période de restriction alimentaire, ils recevaient une ration plus riche en fibres (ajout de paille) et donc diluée en énergie (Tableaux 4 et 5). Cette ration était calculée de façon à engendrer une baisse de 20 % de la production laitière potentielle moyenne des vaches du troupeau.

Les prélèvements et mesures ont été réalisés 5 fois tout au long de l'essai, en semaine S-2, S-1, S+1, S+2 et S+5 (c'est-à-dire la semaine du 6 mars (J-14), du 13 mars (J-7), du 27 mars (J5), du 4 avril (J13) et du 24 avril (J33)).



### III.3. Mesures et analyses réalisées

#### III.3.1. Données zootechniques

La quantité de lait produite a été mesurée et enregistrée pour chaque vache à chaque traite sur toute la durée de l'essai. Tout au long de l'essai, les taux butyreux et protéique (TB et TP) étaient systématiquement mesurés 2 jours par semaine (mardi et jeudi) aux traites du matin et du soir. Le taux de lactose était systématiquement mesuré le mardi aux deux traites. Le CCS était mesuré systématiquement aux traites du mardi matin et jeudi soir. Ces analyses ont été réalisées par méthode infrarouge. Pour les 5 semaines de prélèvement (S-2, S-1, S+1, S+2 et S+5), des analyses de la composition du lait (TB, TP, lactose, CCS) étaient systématiquement réalisées aux deux traites de la journée le jour de prélèvement. La Note d'Etat Corporel (NEC) a été mesurée 1 fois par mois (3 notateurs) et le poids vif relevé 2 fois par semaine. La température ruminale de chaque animal a été mesurée grâce à des Thermobolus® toutes les 30 minutes. Les événements sanitaires observés pendant l'essai ont également été relevés et notés sur un fichier.

#### III.3.2. Analyses réalisées à partir du lait

Pour les 5 semaines de prélèvement (S-2, S-1, S+1, S+2 et S+5), la traite était réalisée systématiquement sur bidon à la traite du matin. Un flacon de 500 mL de lait par vache était récupéré.

##### III.3.2.1. Mesure du $Na^+$ et $K^+$

Le  $Na^+$  et le  $K^+$  ont été dosés par spectrométrie d'absorption atomique de flamme. Le ratio  $Na^+/K^+$  est considéré comme un indicateur de l'ouverture des jonctions serrées au niveau de l'épithélium mammaire. Suite à différents stimuli, l'épithélium peut perdre son intégrité. Ceci se traduit par l'ouverture des jonctions serrées. Ce phénomène entraîne une entrée d'ions  $Na^+$  au niveau de la lumière alvéolaire et une sortie des ions  $K^+$  vers le compartiment sanguin. Une augmentation du ratio  $Na^+/K^+$  traduit donc une ouverture des jonctions serrées au niveau de l'épithélium mammaire (Stelwagen *et al.*, 1994, Ben Chedly *et al.*, 2010).

##### III.3.2.2. Challenge in-vitro : incubation de Cellules Epithéliales Mammaire (CEM) avec *E.Coli* et *S. Aureus*

###### Purification des CEM du lait

###### Purification des CEM du lait

Des échantillons de lait frais ont été collectés pour chaque vache lors de chaque semaine de prélèvement (18 animaux par jour selon la série d'appartenance : série 1 le lundi, série 2 le mardi et série 3 le mercredi). Pour chaque échantillon de lait, 1 tube de 233 g a été centrifugé à 1500 g et 4°C

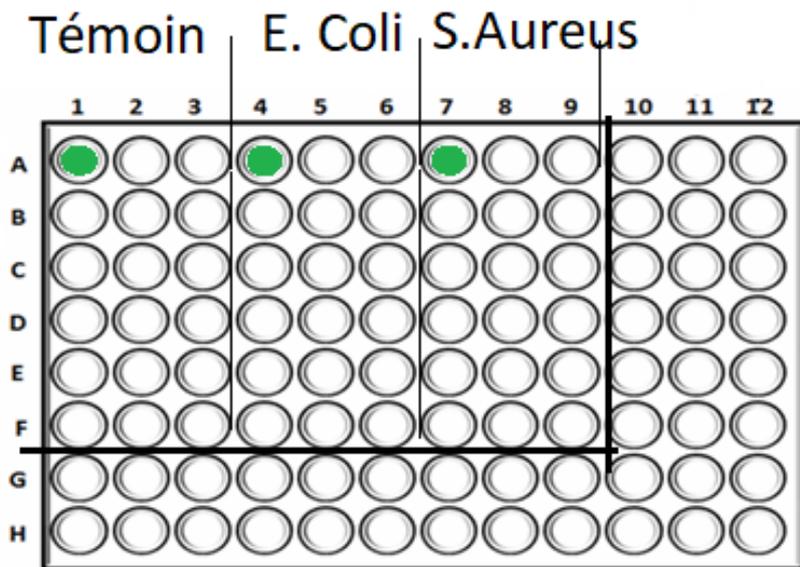


Figure 2 : Schéma d'une plaque initiale servant à l'incubation des cellules épithéliales (CEM) mammaires de 18 vaches prélevées le jour jX d'une des 5 semaines d'expérimentation. Les CEM d'un animal sont incubées en présence d'un milieu de culture (puit témoins), d'une solution contenant E.coli tuée (puit E.coli) et d'une solution contenant S.Aureus tué (puit S.Aureus). La couleur verte sur le schéma correspond donc aux puits utilisés pour l'incubation des CEM d'une vache.

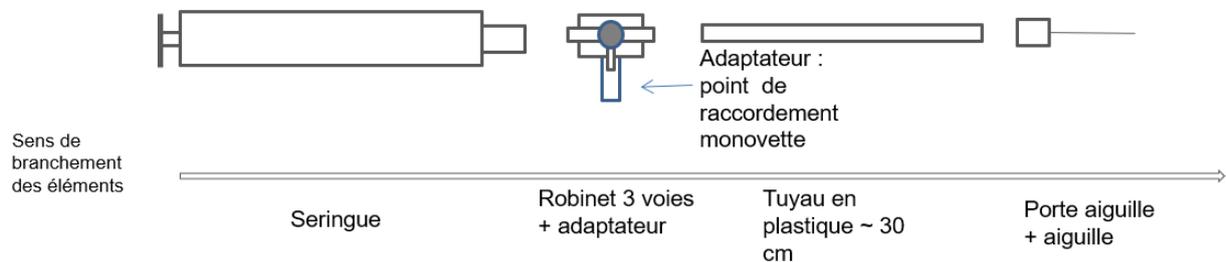


Figure 3 : Dispositif de prélèvement sanguin pour bovin adapté à des prises de sang à la veine jugulaire.

pendant 15 min. La crème et le lait écrémé ont été éliminés après centrifugation pour ne garder que les culots cellulaires. Ceux-ci ont été remis en suspension dans une solution tampon phosphate salin (PBS). La suspension cellulaire a été centrifugée pendant 10 min à 1000 g et 4°C et lavée avec du PBS puis filtrée et centrifugée une dernière fois. Le culot cellulaire a ensuite été remis en suspension dans 500 mL de PBS contenant 1 % d'albumine de sérum bovin (BSA).

Un volume de 200 µL de billes « Dynabeads® » (Thermo Fisher) a été incubé avec 4 µL d'anticorps anti-CEM pendant 30 min sur un portoir rotatif à 4°C. Les « Dynabeads® » (Pan Mouse IgG, Dynal Biotech, Invitrogen) sont des billes magnétiques capables de fixer des anticorps spécifiques anti-CEM dirigés spécifiquement contre plusieurs cytokératines (1, 5, 10 et 14). Les cytokératines sont des protéines spécifiques des CEM. La suspension contenant le complexe billes/anticorps a été placée sur un concentrateur de particules magnétiques (MPC-S ; Dynal Biotech®) correspondant à un portoir aimanté puis les anticorps anti-CEM non liés aux billes ont été éliminés par aspiration du surnageant. Les complexes billes/anticorps ainsi formés ont été remis en suspension dans 990 µL de PBS à 1% BSA et 50 µL ont été distribués dans chacun des échantillons de suspension cellulaire.

Le complexe billes/anticorps et la suspension cellulaire ont été incubés pendant 1 heure sur un portoir rotatif à 4°C. Après un lavage avec du PBS à 1% BSA, les CEM fixées au complexe billes/anticorps ont été récupérées à l'aide d'un portoir aimanté par aspiration du surnageant. Un aliquot de 25 µL de la suspension de CEM purifiées a été utilisé pour l'analyse de la concentration en CEM au TC20, un compteur automatique de cellules en suspension. Le protocole a été intégré sous forme de schémas en annexe 2.

#### Incubation des CEM avec des bactéries tuées

Pour chaque animal et chaque semaine de prélèvement, 100 µL de suspension de CEM ont été mis à incuber à 37 °C avec 100 µL d'une solution tampon (témoin), d'une solution tampon contenant E. Coli tuée ( $10^7$  bactéries/ mL dans une solution RPMI contenant un antibiotique) ou d'une solution tampon contenant S. Aureus tué, dans des plaques 96 puits (figure 2). Après 4h et 24h d'incubation, 100 µL de surnageant de chaque puit utilisé a été collecté et transféré sur une autre plaque 96 puits. La nouvelle plaque a été mise à congeler à -20 °C pour une analyse ultérieure du taux d'IL-8 par dosage ELISA au laboratoire de l'ISP de l'INRA de Tours.

#### III.3.3. Analyses réalisées à partir du sang

A chaque semaine de prélèvement, après la prise d'échantillons de lait à la traite du matin, du sang a été prélevé à la jugulaire (dispositif expérimental figure 3) avant la distribution du repas (animaux à jeun) : 2 vacutainers de 7 mL (1 vacutainer EDTA et 1 vacutainer héparine-Na) et 3 monovettes de 1mL. La numération et formule sanguine ont été déterminées à partir du vacutainer EDTA conservé à 4°C, avec l'appareil MS9-5 (données non valorisées lors de ce stage suite à des modifications des paramètres de l'appareil). Les métabolites (AGNE, glucose,  $\beta$ -OH, et urée) ainsi que le lactose et l'haptoglobine ont été dosés sur le plasma sanguin (après centrifugation du sang du vacutainer héparine-Na) par spectrométrie avec le konélab 20®.



### *III.3.3.1. Challenge in-vitro : incubation du sang total avec E.Coli et S. Aureus*

Pour chaque vache et chaque semaine de prélèvement, les 3 monovettes de 1 mL contenaient les bactéries tuées (une monovette témoin sans bactérie, une monovette « E. Coli », et une monovette « S. Aureus »). Aussitôt après le prélèvement de sang, les monovettes de 1 mL étaient déposées dans un bain à sec à 38.5°C et laissées incuber pendant 23h (annexe 3). Après 23h d'incubation, les monovettes de 1 mL ont été centrifugées (1200g, 2500 rpm pendant 10 min, à T° ambiante), le plasma a été prélevé et 300 µL de chaque monovette a été disposé dans des tubes de 1,5 mL. Les tubes (3 tubes par animal) ont ensuite été congelés à -20°C pour le dosage des chimiokines par la méthode ELISA au laboratoire de l'ISP de l'INRA de Tours.

### *III.3.3.1. Dosage des IL-8 par méthode ELISA*

La veille du dosage, les plaques 96 puits vides ont été tapissées avec l'anticorps anti-IL-8. Une dilution à 2 µg/mL a été réalisée et 50 µL de la solution ont été déposés par puit. Les plaques ont été laissées à incuber une nuit à température ambiante. Le jour du test, la solution de tapissage a été retirée. 300 µL de solution de saturation (PBS-gélatine 0,5%) ont été ajoutés par puit. Les plaques ont été mises à incuber 1 h à température ambiante. La solution de saturation a été éliminée. Une gamme allant de 30 à 2700 pg/mL (dilutions de 3 en 3) d'IL-8 bovine en PBS-gélatine 0,5% a été préparée. Les échantillons à doser ont été ajoutés à raison de 50 µL/puit ainsi que la gamme. Les plaques ont été mises à incuber 2 h à température ambiante. Les plaques ont été lavées 3 fois avec du PBS-Tween 20 0,05% puis l'anticorps de détection (anti-IL-8 ovine MCA1660® dilué au 1/2000) a été ajouté à raison de 50 µL/puit. Les plaques ont été incubées 2 h à température ambiante. Elles ont ensuite été lavées 3 fois avec du PBS-Tween 20 0,05% puis l'anticorps anti-lapin conjugué HPR (Jackson ImmunoResearch®, dilué au 1/20 000 en PBS-gélatine 0,5%) a été ajouté à raison de 50 µL/puit. Les plaques ont été mises à incuber 30 min à température ambiante. Un dernier cycle de lavage a été effectué puis 100 µL/puit de substrat TMB ont été ajoutés. La réaction a été bloquée avec du HCl 1 M. Les résultats ont été analysés par lecture des densités optiques de chaque puit par spectrophotométrie ( $\lambda = 573 - 584$  nm) grâce à un lecteur de plaques ELISA (VersaMax®).

## *III.4. Analyses statistiques*

Le schéma expérimental étant un schéma en continu, l'effet « semaine de prélèvement » (5 semaines) et l'effet « période » (périodes « Témoin » et « restriction alimentaire ») ne pouvaient pas être pris en compte dans le même modèle. Il a donc été décidé d'analyser ces deux effets indépendamment. Chaque modèle annoncé ci-dessous a donc été réalisé deux fois, une première fois pour étudier l'effet du régime et une seconde fois pour étudier l'effet de la semaine sur la variable d'intérêt. Les tableaux de résultats pour les modèles réalisés en prenant l'effet fixe « semaine » sont présentés en annexe 3.



Les données de concentrations plasmatiques en IL-8 et celles des surnageants des cultures de CEM ont été analysées sous le logiciel R par analyse de variance (III) selon le modèle mixte suivant :

$$Y_{ijklmnp} = \mu + T_i + B_j + P_k + H_l + (TB)_{ij} + v_m + (vsl)_{mnp} + \varepsilon_{ijklmnp}$$

Avec :

Y : Paramètre à étudier

$\mu$  : Moyenne

$T_i$  = Effet du traitement (régime alimentaire ou semaine) avec  $i = [1, 2]$  dans le cas du régime ou  $i = [1, 2, 3, 4, 5]$  dans le cas de la semaine

$B_j$  = Effet de la bactérie utilisée pour le challenge in vitro avec  $j = [\text{contrôle, coli, aureus}]$

$P_k$  = Effet de la parité de la vache avec  $k = [\text{primi, multi}]$

$H_l$  = Effet de la santé de l'animal avec  $l = [1, 2]$ , 1 correspond à des animaux peu malades (5 évènements ou moins d'élévation de température détectés grâce au Thermobolus® depuis le début de la lactation), 2 correspond à des animaux plus sensibles (plus de 5 évènements d'élévation de température depuis le début de la lactation)

$(TB)_{ij}$  = Effet de l'interaction traitement\*bactérie

$v_m$  = Effet aléatoire de la vache avec  $m = [1, (\dots), 54]$

$(vsl)_{mnp}$  = Effet aléatoire de l'interaction vache : semaine : lot avec  $m = [1, (\dots), 54]$  ;  $n = [1, 2, 3, 4, 5]$ ,  $l = [1, 2, 3]$

$\varepsilon_{ijklmnp}$  = Erreur associée au modèle

Les données de concentrations en métabolites plasmatiques et zootechniques (exceptés les CCS et les CEM) ont été analysées sous le logiciel R par analyse de variance (III) selon le modèle mixte suivant :

$$Y_{ijklmnp} = \mu + T_i + P_k + H_l + (TB)_{ij} + v_m + (sl)_{np} + \varepsilon_{ijklmnp}$$

Avec :

Y : Paramètre à étudier

$\mu$  : Moyenne

$T_i$  = Effet du traitement (régime alimentaire ou semaine) avec  $i = [1, 2]$  dans le cas du régime ou  $i = [1, 2, 3, 4, 5]$  dans le cas de la semaine

$P_k$  = Effet de la parité de la vache avec  $k = [\text{primi, multi}]$

$H_l$  = Effet de la santé de l'animal avec  $l = [1, 2]$ , 1 correspond à des animaux peu malades (5 évènements ou moins d'élévation de température depuis le début de la lactation), 2 correspond à des animaux plus sensibles (plus de 5 évènements d'élévation de température depuis le début de la lactation)

$(TB)_{ij}$  = Effet de l'interaction traitement\*bactérie

$v_m$  = Effet aléatoire de la vache avec  $m = [1, (\dots), 54]$

$(sl)_{np}$  = Effet aléatoire de l'interaction semaine : lot avec  $n = [1, 2, 3, 4, 5]$ ,  $l = [1, 2, 3]$

$\varepsilon_{ijklmnp}$  = Erreur associée au modèle

Le score cellulaire (SCS) a été calculé à partir du comptage de cellules somatiques dans le lait (SCC) par transformation logarithmique en base 2 :  $SCS = \log_2 (CCS / 100\,000) + 3$  (Rupp and Boichard, 1997) afin que les résidus du modèles suivent une loi normale.

Les taux de CEM et quantité de CEM exfoliées par jour ne pouvaient pas être analysés avec le modèle précédent car les résidus du modèle ne suivaient pas une loi normale. Ils ont, par conséquent, été analysés par modèle linéaire généralisé selon une loi binomiale négative.

Tableau 6 : Production laitière et composition du lait de vaches laitières Prim'Holstein (n=54) ayant été alimentées avec un régime standard pendant deux semaines suivies par un régime restreint pendant 5 semaines (moyenne ± SEM).

	Régime standard	Régime restreint	SEM	p-value		
				Régime	Parité	Santé
Production laitière (kg/j)	34.9 <sup>a</sup>	31.8 <sup>b</sup>	0.62	<0.0001 ***	<0.0001 ***	0.19
Taux butyreux (g/kg)	39.7 <sup>a</sup>	38.8 <sup>b</sup>	0.69	0.02 *	0.21	0.63
Matières grasses (g/j)	1354 <sup>a</sup>	1214 <sup>b</sup>	24.98	<0.0001 ***	0.003 **	0.47
Taux protéique (g/kg)	31.7 <sup>a</sup>	31.4 <sup>b</sup>	0.37	0.007 **	0.26	0.83
Matières protéiques (g/j)	1087 <sup>a</sup>	985 <sup>b</sup>	19.4	<0.0001 ***	<0.0001 ***	0.10
Lactose lait (g/kg)	49.8 <sup>a</sup>	49.5 <sup>b</sup>	0.21	0.0009 ***	0.30	0.97
Quantité de lactose (g/j)	1738	1577	35.3	<0.0001 ***	<0.0001 ***	0.19
SCS	1.74 <sup>b</sup>	1.98 <sup>a</sup>	0.176	0.0004 ***	0.0009 ***	0.78
Quantité de cellules somatiques (x 10 <sup>3</sup> cell/j)	2825	2734	507.0	0.78	0.001 **	0.94

Tableau 7 : Concentration en Interleukine 8 (IL-8) dans le plasma ou dans le surnageant de culture de cellules épithéliales mammaires (CEM) de vaches Prim'Holstein (n=54) en fonction du régime alimentaire (standard ou restreint) suivi par les animaux et du milieu d'incubation (solution témoin, solution contenant des bactéries tuées, *Escherichia Coli* ou *Staphylococcus Aureus*) (Moyenne ± SEM).

	Régime standard			Régime restreint			SEM	p-value				
	contrôle	E.coli	S.Aureus	contrôle	E.coli	S.Aureus		Régime	Bactérie	Parité	Santé	Régime*Bactérie
IL-8 sang (ng/mL)	1.72 <sup>c</sup>	109.14 <sup>b</sup>	107.11 <sup>b</sup>	1.10 <sup>c</sup>	141.72 <sup>a</sup>	143.95 <sup>a</sup>	5.983	0.93	<0.0001 ***	0.50	0.79	0.0002 ***
IL-8 CEM (ng/mL)	0.99 <sup>ab</sup>	0.80 <sup>b</sup>	0.97 <sup>ab</sup>	1.15 <sup>a</sup>	0.93 <sup>ab</sup>	1.01 <sup>ab</sup>	0.150	0.29	0.01 *	<0.0001 ***	0.26	0.46

## IV. Résultats

### IV.1. La restriction alimentaire modifie les performances zootechniques et la composition du lait

Le changement de régime alimentaire a eu un effet significatif sur la production laitière et la composition du lait (tableau 6). Comme attendu, la restriction alimentaire a entraîné une baisse de production laitière de  $3 \pm 0,62$  kg (soit 9%,  $P < 0.0001$ ) avec le régime restreint par rapport au régime standard. La restriction alimentaire a influencé la composition fine du lait. Le TB, TP et le taux de lactose du lait ont diminué respectivement de  $1,2 \pm 0,69$  g/kg ( $P < 0.05$ ),  $0,5 \pm 0,37$  g/kg ( $P < 0.01$ ) et de  $0,4 \pm 0,21$  g/kg ( $P < 0.0001$ ) avec le régime restreint par rapport au régime standard. Ces variations des taux sont dues à une diminution plus importante de la quantité de matières grasses, matières protéiques et quantité de lactose que celle de la production de lait : respectivement 11% ( $140 \pm 24,4$  g/j), 10% ( $102 \pm 19,3$  g/j) et 10% ( $161 \pm 35,3$  g/j). Le SCS a diminué de  $0,24 \pm 0,174$  point avec le régime restreint par rapport au régime standard. La quantité de cellules somatiques exfoliées par jour n'a pas été influencée significativement par le régime. Lors de cette étude, les évènements de mammites ont été recensés quotidiennement par les animaliers et identifiés par analyse des CCS. Lors des 8 semaines de déroulement de l'essai, 7 animaux ont contracté une mammite clinique.

L'étude des résultats en cinétique (semaine par semaine) montre que la production laitière a diminué significativement dès la semaine suivant le changement de régime (annexe 4). Celle-ci s'est par la suite stabilisée puis a diminué à nouveau significativement la 5<sup>ème</sup> semaine (semaine 2 contre 5,  $P = 0.002$ ) (annexe 4). Le TB a diminué significativement la semaine suivant le changement de régime alimentaire (semaine -1 contre 1,  $P = 0.05$ ) puis s'est stabilisé les semaines suivantes. Le TP a diminué significativement seulement la 5<sup>ème</sup> semaine suivant le changement de régime (semaine -2 contre 5,  $P = 0.001$ ). Le taux de lactose du lait a diminué significativement à partir de la 2<sup>ème</sup> semaine suivant le changement de régime (semaine -2 contre 2,  $P = 0.03$ ).

### IV.2. La restriction alimentaire modifie le statut inflammatoire

#### IV.2.1. Incubation du sang en présence de bactéries tuées

La présence de bactéries tuées dans le milieu d'incubation a provoqué la production d'IL-8 par les cellules sanguines (tableau 7). En l'absence de bactéries tuées (monovette contrôle), le taux d'IL-8 est resté très faible ( $1,72$  ng/mL chez le contrôle versus  $109,14$  et  $107,11$  ng/mL chez les cellules ayant été incubées avec *E. Coli* ou *S. Aureus* respectivement). Cette production d'IL-8 en présence des bactéries tuées a été différente selon le régime alimentaire. La concentration en IL-8 dans le plasma en contact avec les bactéries *E. Coli* ou *S. Aureus* est 1,4 fois plus importante dans le cas du régime restreint par rapport au régime standard (respectivement  $141,72$  et  $143,95$  ng/mL contre  $109,14$  et  $107,11$  ng/mL de plasma).

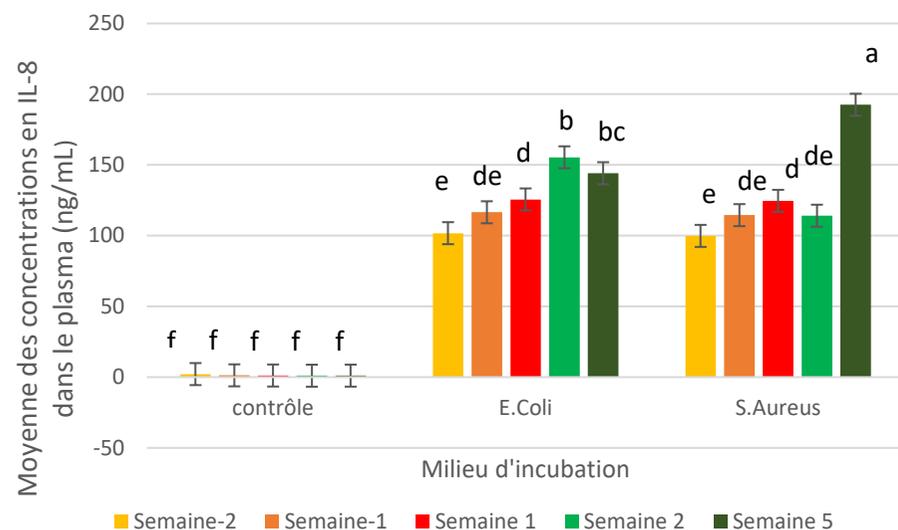


Figure 4 : Concentration plasmatique en Interleukine 8 en ng/mL de vaches Prim'Holstein (n=54) incubées avec une solution témoin, une solution contenant *Escherichia Coli* ou *Staphylococcus Aureus* tués en fonction de la semaine de prélèvement, -2 et -1 où les vaches sont alimentées avec un régime standard et 1, 2 et 5 où elles sont alimentées avec un régime restreint (moyenne  $\pm$ SEM).

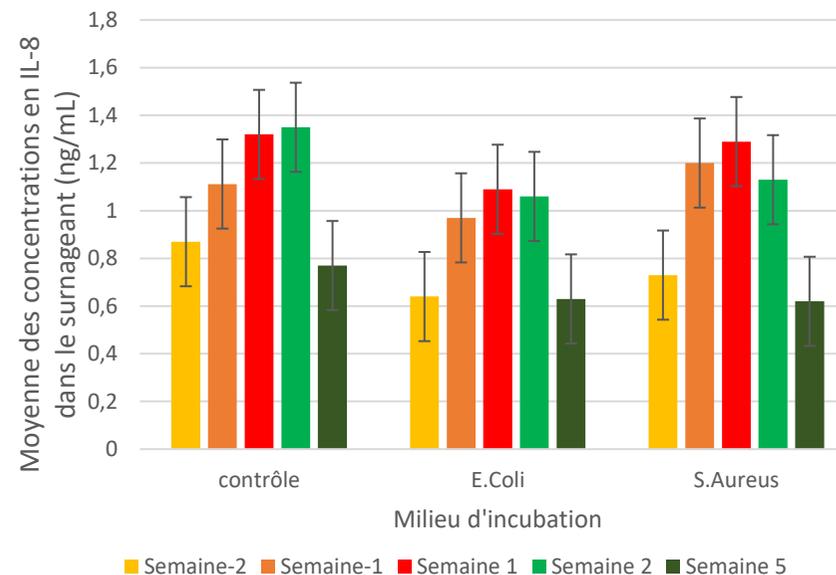


Figure 5 : Concentration en Interleukine 8 en ng/mL dans le surnageant de culture de cellules épithéliales mammaires de vaches Prim'Holstein incubées avec une solution témoin, une solution contenant *Escherichia Coli* ou *Staphylococcus Aureus* tués en fonction de la semaine de prélèvement, -2 et -1 où les vaches sont alimentées avec un régime standard et 1, 2 et 5 où elles sont alimentées avec un régime restreint (moyenne  $\pm$ SEM).

Tableau 8: Concentrations en métabolites plasmatiques de vaches laitières Prim'Holstein (n=54) ayant été alimentées avec un régime standard pendant deux semaines suivies par un régime restreint pendant 5 semaines. (moyenne  $\pm$  SEM).

Plasma sanguin	Régime standard	Régime restreint	SEM	p-value		
				Régime	Parité	Santé
Urée (mg/L)	391.3 <sup>a</sup>	240.9 <sup>b</sup>	13.16	<0.0001 ***	0.59	0.07
AGNE ( $\mu$ mol/L)	144.1	144.5	12.69	0.98	0.43	0.59
Glucose (mg/L)	663.6 <sup>a</sup>	621.9 <sup>b</sup>	8.24	<0.0001 ***	0.23	0.43
B-OH ( $\mu$ mol/L)	665.8 <sup>a</sup>	600.5 <sup>b</sup>	19.37	0.0006 ***	0.84	0.63
Lactose (mg/L)	30.2 <sup>b</sup>	33.6 <sup>a</sup>	1.41	0.002 **	0.003 *	0.67
Haptoglobine (mg/mL)	114.5	107.0	13.2	0.53	0.03 *	0.97

L'étude des résultats en cinétique (5 semaines de prélèvement) montre que les profils de réponses diffèrent entre les deux bactéries tuées : il existe une interaction entre la semaine et la bactérie ( $P < 0.0001$ ; figures 4 et 5 et annexe 3). Les concentrations en IL-8 dans le plasma des monovettes « Contrôle » sont restées très faibles et stables au cours de l'expérimentation. La concentration en IL-8 du plasma incubé avec *E. Coli* a atteint une valeur maximale (de 155.39 ng/mL) la 2<sup>ème</sup> semaine suivant le changement de régime puis n'a pas varié significativement. La concentration en IL-8 dans le plasma incubé avec *S. Aureus* a augmenté légèrement en semaine 2 (comparativement à la semaine -1) mais a surtout augmenté de manière importante en semaine 5 (+75 ng/mL).

#### IV.2.2. Incubation du sang en présence de CEM isolées à partir des cellules somatiques du lait

Les teneurs en IL-8 des surnageants contenant les CEM incubées sont restées très faibles pour les solutions « Contrôle », *E. Coli* et *S. Aureus* (Tableau 7). Elles étaient même légèrement inférieures pour les CEM incubées en présence de bactéries tuées par rapport aux CEM « Contrôle » ( $P < 0.05$ ). La concentration en IL-8 du surnageant contenant des CEM incubées avec une solution témoin est plus élevée que les concentrations en IL-8 dans les surnageants incubés avec *E. Coli* ou *S. Aureus*. Il est donc nécessaire de regarder ce résultat avec précaution. Les CEM incubées avec une solution témoin, *E. Coli* ou *S. Aureus* n'ont pas répondu au challenge inflammatoire.

Le changement de régime alimentaire n'a pas influencé la concentration en IL-8 dans le surnageant des CEM incubées avec une solution témoin, *E. Coli* ou *S. Aureus*. De même, l'étude en cinétique ne montre pas d'évolution significative au cours du temps, c'est-à-dire entre les semaines (figure 2).

La restriction alimentaire n'a pas eu d'effet significatif sur la concentration plasmatique en haptoglobine (tableau 8).

#### IV.3. La restriction alimentaire modifie le statut métabolique

La restriction alimentaire a entraîné une diminution de 62% de la concentration plasmatique en urée ( $P < 0.0001$ ) (tableau 8), une diminution de la concentration plasmatique en  $\beta$ -OH de 10% ( $p=0.0006$ ), une diminution de la concentration plasmatique en glucose de 7% ( $P < 0.0001$ ). La restriction n'a pas eu d'effet sur la concentration plasmatique en AGNE.

L'étude des résultats en cinétique montre que les concentrations plasmatiques d'urée, de glucose et de  $\beta$ -OH ont évolué au cours du temps (annexe 4). La concentration en urée a diminué significativement la semaine suivant le changement de régime (semaine -1 contre semaine 1,  $p=0.0007$ ). Elle est restée stable la semaine 2 puis a diminué à nouveau en semaine 5 (semaine 2 contre 5,  $p$ -value= 0.0002). La concentration plasmatique en glucose a aussi diminué la semaine suivant le changement de régime alimentaire. La diminution s'est atténuée à la 5<sup>ème</sup> semaine. La concentration en  $\beta$ -OH a aussi diminué la semaine suivant le changement de régime puis est restée stable sur le reste de la période d'expérimentation.

Tableau 9 : Taux de cellules épithéliales mammaires (CEM) exfoliées, quantité de CEM exfoliées par jour, concentrations en lactose, sodium et potassium dans le lait de vaches laitières Prim'Holstein (n=54) ayant été alimentées avec un régime standard pendant deux semaines suivies par un régime restreint pendant 5 semaines (moyenne ± SEM).

	Régime standard	Régime restreint	SEM	p-value		
				Régime	Parité	Santé
<b>Na<sup>+</sup> (g/kg)</b>	309.1 <sup>b</sup>	322.3 <sup>a</sup>	5.73	<0.0001 ***	0.0004 ***	0.48
<b>K<sup>+</sup> (g/kg)</b>	1725.7 <sup>a</sup>	1674.5 <sup>b</sup>	14.02	<0.0001 ***	0.03*	0.30
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (%)</b>	18.0 <sup>b</sup>	19.4 <sup>a</sup>	0.40	<0.0001 ***	0.0002 ***	0.33
<b>CEM (x 10<sup>3</sup> cell/mL lait)</b>	5.72 <sup>b</sup>	9.99 <sup>a</sup>	1.080	0.02*	0.0004***	0.57
<b>Quantité de CEM exfoliées (x 10<sup>6</sup> cell/j)</b>	19.1 <sup>b</sup>	32.0 <sup>a</sup>	5.73	0.06.	<0.0001 ***	0.39

Tableau 10 : Production laitière, composition du lait, taux de cellules épithéliales mammaires (CEM) exfoliées et données zootechniques de vaches laitières Prim'Holstein (n=54) primipares ou multipares (moyenne ± SEM).

	Primipares	Multipares	SEM	p-value parité
<b>Production laitière (kg/j)</b>	30.9 <sup>b</sup>	35.8 <sup>a</sup>	0.96	<0.0001 ***
<b>Matières grasses (g/j)</b>	1215 <sup>b</sup>	1353 <sup>a</sup>	34.0	0.003**
<b>Matières protéiques (g/j)</b>	972 <sup>b</sup>	1100 <sup>a</sup>	25.4	0.0002***
<b>SCS</b>	1.27 <sup>b</sup>	2.46 <sup>a</sup>	0.257	0.0009***
<b>CEM (x 10<sup>3</sup> cell/mL lait)</b>	3.64 <sup>b</sup>	9.88 <sup>a</sup>	0.928	0.0004***
<b>Poids vif (kg)</b>	620.4 <sup>b</sup>	690.4 <sup>a</sup>	11.78	<0.0001 ***

Tableau 11 : Concentrations en lactose dans le plasma, sodium et potassium dans le lait de vaches laitières Prim'Holstein (n=54) primipares ou multipares (moyenne ± SEM).

	Primipares	Multipares	SEM	p-value parité
<b>Lactose plasmatique (mg/L)</b>	28.3 <sup>b</sup>	35.5 <sup>a</sup>	1.68	0.003*
<b>Na<sup>+</sup> (g/kg)</b>	295 <sup>b</sup>	336 <sup>a</sup>	8.3	0.0004***
<b>K<sup>+</sup> (g/kg)</b>	1728 <sup>a</sup>	1671 <sup>b</sup>	19.5	0.03*
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (%)</b>	17.2 <sup>b</sup>	20.2 <sup>a</sup>	0.59	0.0002***
<b>Haptoglobine (mg/mL)</b>	86.3 <sup>b</sup>	135.2 <sup>a</sup>	16.55	0.03*

#### IV.4. La restriction alimentaire est associée à des modifications de l'intégrité de l'épithélium mammaire

L'analyse des concentrations en  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  dans le lait par spectrométrie de masse montre des variations significatives de ces deux ions dans le lait en fonction du régime alimentaire suivi par les animaux (tableau 9). La restriction alimentaire a entraîné une augmentation de 4% de la concentration en  $\text{Na}^+$  dans le lait ( $P < 0.0001$ ), une diminution de 3 % de la concentration en  $\text{K}^+$  ( $P < 0.0001$ ), et ainsi une augmentation de 1,4 point du ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ( $P < 0.0001$ ). La restriction a également amené une augmentation du lactose sanguin de 11% ( $P = 0.002$ ). La quantité de CEM, exfoliées dans le lait par jour, a eu tendance à augmenter de 43 % avec la restriction ( $p=0,06$ ).

La semaine de prélèvement a influencé significativement la concentration plasmatique en  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et lactose ainsi que le ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (annexe 4). La concentration plasmatique en  $\text{Na}^+$  a diminué significativement la 5<sup>ème</sup> semaine de prélèvement (semaine 1 contre 5,  $P = 0,0003$ ). La concentration plasmatique en  $\text{K}^+$  a augmenté significativement dès la semaine suivant le changement de régime (semaine -1 contre 1,  $P = 0,005$ ). Le ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  a augmenté significativement la semaine suivant la transition alimentaire (semaine -1 contre semaine 1,  $P = 0,0006$ ) puis est resté stable la semaine 2 et 5. Le lactose sanguin a augmenté significativement en semaine 2 et en semaine 5.

#### IV.5. La parité modifie la réponse des vaches laitières face à la restriction alimentaire

La production de lait et la composition du lait ont varié selon la parité : la production de lait, de matières grasses et de matières protéiques a été supérieure respectivement de 15 ( $P < 0.0001$ ), 10 ( $P = 0.003$ ) et 12% ( $P = 0.0002$ ) chez les vaches multipares par rapport aux primipares (Tableau 10). Le SCS qui était supérieur de 1,20 point chez les multipares par rapport aux primipares ( $P = 0.0009$ ).

La concentration plasmatique en haptoglobine était supérieure de 47% chez les vaches multipares par rapport aux primipares ( $P = 0.03$  ; tableau 11).

La concentration en IL-8 des surnageants des cellules sanguines incubées en présence ou non de bactéries tuées n'a pas été modifiée par le rang de lactation des animaux. Vaches primipares et multipares ont répondu de la même façon lors de cette incubation. Cependant, les surnageants des CEM issues de vaches multipares ont présenté une concentration en IL-8 plus forte que les CEM issues des vaches primipares (figure 6). Par exemple, la concentration moyenne d'IL-8 dans le surnageant de culture des CEM incubées avec une solution témoin était 77% plus élevée chez les multipares que chez les primipares. La concentration moyenne d'IL-8 dans le surnageant de culture des CEM incubées avec *E. coli* issues des vaches multipares est 88% plus élevée que la concentration moyenne en IL-8 dans le surnageant contenant des CEM issues de vaches primipares. Enfin, la concentration en IL-8 des CEM incubées avec *S. Aureus* est plus élevée de 82% chez les multipares par rapport aux primipares. Ces résultats sont à regarder avec précaution car la concentration en IL-8 des contrôles est supérieure aux concentrations en IL-8 dans le surnageant des cellules incubées avec *E. Coli* et *S. Aureus*.

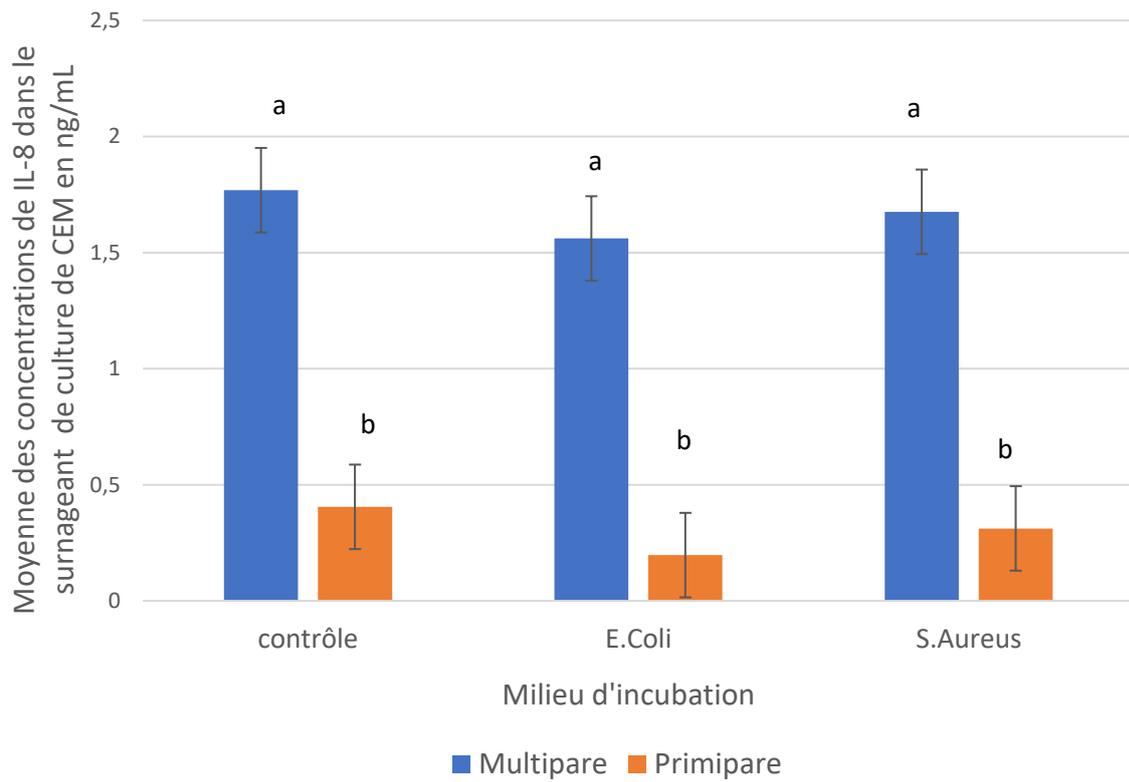


Figure 6 : Concentration en Interleukine 8 en ng/mL de vaches Prim Holstein (n=54) dans le surnageant de culture de cellules épithéliales mammaires en fonction de la parité (primipare/multipare) et du milieu d'incubation (solution témoin, solutions contenant *Escherichia Coli* ou *Staphylococcus Aureus* tués) (moyenne  $\pm$  SEM).

La perméabilité de l'épithélium mammaire et le nombre de CEM exfoliées dans le lait ont varié en fonction de la parité. Les vaches multipares présentaient un épithélium moins imperméable et contenaient plus de CEM exfoliées dans leur lait que les vaches primipares. En effet, la concentration plasmatique en lactose était 20% plus élevée chez les vaches multipares ( $P = 0.003$ ). La concentration en  $K^+$  dans le lait était 3% plus faible chez les multipares ( $P = 0.03$ ) tandis que les concentrations de  $Na^+$  ( $P = 0.0004$ ) et le ratio  $Na^+/K^+$  ( $P = 0.0002$ ) étaient plus élevés de respectivement 12% et 15% chez les multipares. A contrario, la parité n'a pas influencé significativement le taux de lactose du lait (tableau 11).

## V. Discussion

L'objectif de l'étude était de tester si la restriction alimentaire modifiait la capacité de l'organisme à déclencher une réponse inflammatoire. Il a été supposé que les animaux restreints auraient des réactions plus fortes que des animaux nourris à hauteur de leur besoin lors d'un challenge inflammatoire. Le second objectif était d'étudier spécifiquement la réponse des CEM face à un challenge bactérien in-vitro dans le cas d'une restriction alimentaire. L'hypothèse formulée était que les CEM jouaient un rôle crucial dans la réponse inflammatoire au niveau de la mamelle.

### V.1. Réflexions sur le déroulement et les modèles de l'étude

Le schéma expérimental utilisé est un schéma en continu où les animaux sont leur propre témoin. Il n'y avait pas un 2<sup>ème</sup> lot d'animaux "témoins" alimentés de façon à couvrir leurs besoins nutritionnels sur toute la durée de l'expérimentation. Ceci a posé un problème lors de l'écriture du modèle statistique car l'effet du régime alimentaire pouvait être confondu avec l'effet de l'avancée de la lactation ou encore l'effet du temps. Le schéma expérimental utilisé lors de cette étude crée un doute modéré sur la validité des résultats issus de nos modèles statistiques. Pour s'affranchir de ces deux derniers effets et être certains de l'existence d'un effet du changement de régime alimentaire, il aurait été intéressant de conduire deux lots d'animaux en parallèle et de croiser les régimes alimentaires : un premier lot recevant d'abord le régime standard puis le régime restreint et un second lot recevant le régime restreint puis le régime standard. Une autre solution aurait été de rajouter une période à la suite de la période de restriction durant laquelle les animaux auraient été nourris avec le régime alimentaire standard pour revenir à l'état basal.

Le choix du modèle expérimental pour tester la réaction inflammatoire pourrait également être discuté. De nombreuses études autour de la réaction inflammatoire ont été réalisées in-vivo, en injectant du LPS directement dans un ou plusieurs quartiers de la mamelle. Dans le cas d'un challenge in-vivo le lait ne peut pas être vendu et les animaux doivent être traités, à postériori, par antibiotiques. Ceci engendre des pertes économiques conséquentes et pose des questions éthiques. Le challenge in-vitro présente l'avantage de limiter les pertes économiques pour la station expérimentale et présente également un avantage éthique puisque des bactéries ne sont pas inoculées directement dans la mamelle. Ainsi, les animaux ne doivent pas directement faire face au challenge inflammatoire et lutter contre l'infection.



Le challenge utilisé dans cette étude a été développé par l'équipe de G. Foucras de l'ENV de Toulouse. A ma connaissance, il n'a fait l'objet d'aucune publication montrant la capacité de ce test à expliquer des différences observées *in vivo*. Néanmoins, les variations significatives observées dans notre étude lors de l'incubation d'agents pathogènes avec des cellules sanguines, ayant des fonctions immunitaires, montrent une bonne sensibilité de ce test et son aptitude à mettre en évidence l'effet de facteurs.

Contrairement au challenge sur cellules sanguines, celui sur CEM isolées du lait n'a pas fonctionné. Deux hypothèses pourraient expliquer l'absence de réponse des CEM isolées du lait lors du challenge. Il se pourrait 1) que le processus naturel d'exfoliation ainsi que la méthode de purification aient entraîné une perte partielle de fonctionnalité des CEM issues du lait ou 2) que le milieu de culture, RPMI®, ne contenait pas les éléments nécessaires à l'expression de la fonction immunitaire des CEM. Afin de tester la 1<sup>ère</sup> hypothèse, il pourrait être envisagé de recommencer le challenge inflammatoire avec des CEM issues de cultures de lignées en laboratoire. Celles-ci n'auraient alors pas subi le processus d'exfoliation. Pour tester la 2<sup>ème</sup> hypothèse il serait intéressant de recommencer le test en utilisant du sérum directement prélevé sur l'animal comme milieu de culture.

## V.2. Effet de la restriction alimentaire

### V.2.1. Sur les paramètres zootechniques

Dans cette étude, la restriction alimentaire de 5 semaines réalisée à  $201 \pm 10$  jours de lactation a entraîné une diminution de la production laitière de 9%. De tels effets négatifs ont déjà été observés (Guinard-Flament *et al.*, 2006, Dessauge *et al.*, 2011, Gross *et al.*, 2011). Les quantités de matière grasses, de matières protéiques et de lactose journalières ont diminué et parfois de façon plus importante que la production de lait provoquant alors la diminution des taux, comme observé dans des études précédentes pour le TP et le taux de lactose (Guinard-Flament *et al.*, 2006, Dessauge *et al.*, 2011). La diminution du TB observée dans notre étude n'est pas en accord avec la majorité des études qui au contraire montrent que la restriction alimentaire n'affecte pas le TB (Gross *et al.*, 2011; Guinard-Flament *et al.*, 2006, Friggens *et al.*, 1998). A notre connaissance, une seule étude a montré une baisse du TB ( $- 6,3 \pm 2,08$  kg). La restriction était alors appliquée sur des vaches laitières Prim'Holstein recevant un régime à base d'herbe (Herve *et al.*, 2017). Sur le plan métabolique, la restriction alimentaire n'a pas entraîné d'augmentation de la concentration plasmatique en AGNE. Par contre, elle a provoqué une diminution de la concentration plasmatique en glucose, en urée et  $\beta$ -OH, comme observé dans des études antérieures (Guinard-Flament *et al.*, 2006, Gross *et al.*, 2013). Dans notre essai il était attendu une diminution de production laitière de 20% d'après les calculs sur la qualité de la ration offerte. Celle observée (- 9%) est donc plus faible. L'ingestion a dû être plus importante que celle attendue. L'absence de diminution du poids vif et les niveaux faibles d'AGNE dans le sang sous-tendent qu'il n'y a pas eu de mobilisation sévère des réserves corporelles en réponse à la restriction alimentaire. Le déficit énergétique créé a peut-être été moins important que celui prévu initialement dans le protocole. Cela sera à vérifier lors de l'analyse des résultats sur les



quantités ingérées et les bilans énergétiques et azotés, ces calculs étant indispensables pour évaluer la sévérité de la restriction alimentaire réalisée.

#### V.2.2. Sur la santé de la mamelle et l'intégrité de l'épithélium mammaire

Dans notre étude, la restriction alimentaire a entraîné une augmentation des SCS de 23%, traduisant une inflammation locale. La restriction alimentaire est connue pour augmenter le SCS (Abdelatty et al, 2017 ; Herve et al, soumis à JDS). Les analyses statistiques ont été réalisées une seconde fois pour les variables des concentrations en IL-8, des concentrations en métabolites et celles qui concernaient les paramètres zootechniques en éliminant les animaux atteints de mammite clinique (4 animaux) lors de la phase 1 (S-2, S-1) de l'essai. Aucun changement significatif dans les résultats n'a été observé. Le nombre d'animaux étudiés ne suffit pas pour conclure sur le lien entre santé de la mamelle et restriction alimentaire au vu de la faible occurrence des mammites à ce stade de lactation.

L'analyse de la composition du lait et du taux de lactose sanguin montre que la restriction alimentaire favorise l'ouverture des jonctions serrées au niveau de l'épithélium mammaire dès la semaine suivant le début de la restriction. En effet l'augmentation du ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dans le lait, du taux de lactose dans le sang et la baisse du taux de lactose dans le lait suggèrent une augmentation de la perméabilité de l'épithélium mammaire. Une étude récente montre qu'une restriction alimentaire de 20% (réalisée à  $77 \pm 5$  JDL) a entraîné une augmentation du  $\text{Na}^+$  dans le lait dans les 30 jours suivants le début de la restriction (Herve et al, soumis à Journal of Dairy Science, JDS). A contrario, une restriction de 30% des besoins nutritionnels n'entraîne pas de modification de l'intégrité de l'épithélium mammaire dans les 7-14 jours qui suivent le changement de régime alimentaire (Guinard-Flament *et al.*, 2007). Dans notre étude, les indicateurs d'ouverture des jonctions serrées montrent que la restriction a provoqué une augmentation de la perméabilité de l'épithélium mammaire.

Chez les vaches laitières, une diminution de la production laitière a été précédemment associée à une augmentation du taux d'exfoliation des CEM en réponse à des changements physiologiques ou des facteurs d'élevage (Herve et al., 2016). L'exfoliation de CEM pourrait être un indicateur de la variation du nombre de CEM dans le tissu mammaire. Dans notre étude la diminution de la production laitière a été associée à une augmentation de 43% du taux d'exfoliation des CEM. La quantité de CEM exfoliées par jour en fonction des semaines de prélèvement a augmenté progressivement. Cette augmentation progressive a été observée dès la phase 1 (S-2 et S-1) suggérant qu'il s'agit, ici, d'un effet de l'avancée de la lactation, comme précédemment observé (Herve et al., 2016).

Il a récemment été démontré que le cortisol était négativement corrélé au taux d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires : il pourrait jouer un rôle dans la limitation du processus d'exfoliation des CEM (Herve et al., 2017). Par ailleurs il est connu que le cortisol entraîne une fermeture des jonctions serrées *in vivo* (Thompson, 1996). Dans une étude récente, une restriction alimentaire de 20% (vaches de race Prim'Holstein à  $77 \pm 5$  JDL, alimentées à hauteur de 80% de leur ingestion de



Matière Sèche, IMS, ad libitum) a entraîné une diminution de la concentration plasmatique en cortisol mesurée après la traite chez les animaux du lot restreint par rapport aux animaux du lot contrôle (6,4 vs 8,7 ng/mL,  $p < 0,05$ ) (Herve et al, publication soumise à JDS). Les concentrations basales en cortisol des animaux des 2 groupes étaient similaires. Des concentrations moins élevées en cortisol entraîneraient une ouverture des jonctions serrées et contribueraient à la perte de l'intégrité de l'épithélium mammaire lors d'une restriction alimentaire. Il pourrait être intéressant de doser le cortisol dans le plasma collecté lors de notre expérimentation afin d'étudier les mécanismes en lien avec la perte d'intégrité lors de la restriction alimentaire. Cette analyse complémentaire n'a pas pu être réalisée au cours de ce stage par manque de temps.

### V.2.3. Sur le statut inflammatoire

La première hypothèse selon laquelle la restriction alimentaire modifiait la capacité des cellules à répondre à un challenge inflammatoire peut être validée dans le cas des cellules sanguines. La mise en contact du sang avec des bactéries a entraîné une production d'IL-8 par les cellules sanguines, production qui a été différente selon le type de bactéries tuées utilisées. Un effet de l'interaction entre le régime alimentaire et les bactéries a également été observé. Ceci montre que la restriction alimentaire augmente la capacité des cellules sanguines à répondre à un challenge inflammatoire.

La réponse inflammatoire supérieure des cellules plasmatiques incubées avec *E. Coli* ou *S. Aureus* en cas de restriction alimentaire pourrait être liée à une variation des métabolites présents dans le plasma. En effet, le changement d'environnement cellulaire pourrait expliquer les profils de réponses différentes des cellules sanguines face aux challenges avec *E. Coli* ou *S. Aureus*. Plusieurs études se sont penchées sur les effets des concentrations en métabolites sur les fonctions immunitaires de cellules sanguines saines. Ster et son équipe (2012) ont démontré qu'il existait une corrélation négative (-0,86) entre la concentration en  $\beta$ -OH et AGNE dans le sérum et la prolifération cellulaire des cellules sanguines mononucléées et des leucocytes polynucléés (Ster *et al.*, 2012). Loïselle et son équipe (2009) ont observé que des concentrations élevées en AGNE in vitro engendraient chez les lymphocytes une diminution de la capacité à produire IFN- $\gamma$  (Loïselle et al., 2009). Des changements hebdomadaires de concentrations plasmatiques en glucose ainsi qu'en  $\beta$ -OH ont été mises en évidence au cours de l'expérimentation (annexe 4). Une analyse des corrélations entre les concentrations plasmatiques en métabolites (Glucose, AGNE,  $\beta$ -OH, lactose, urée) et les concentrations en IL-8 plasmatiques dans les monovettes contrôles, *E. Coli* et *S. Aureus* a été réalisée sous Epsilon® afin de décrire les liens entre les différentes variables. Cependant, aucune corrélation significative n'a été mise en évidence. Dans le cas de cette étude, les concentrations en métabolites ne peuvent pas expliquer les variations de concentration plasmatiques en IL-8.

La réponse inflammatoire supérieure des cellules plasmatiques en cas de restriction pourrait être médiée par une baisse de la cortisolémie. En effet, une étude récente a montré qu'une restriction alimentaire de 20% entraînait une diminution de la concentration plasmatique en cortisol mesurée après la traite chez les animaux du lot restreint par rapport aux animaux du lot contrôle (Herve et al, publication soumise à JDS). Il est connu que les glucocorticoïdes naturels ou artificiels inhibent la réponse inflammatoire face à l'invasion de microbes et évitent l'inflammation excessive du corps



(Barnes, 1998 and 2010). Le cortisol est connu pour son action anti-inflammatoire et immunosuppressive (Ciliberti et al., 2017). Par ailleurs, un effet inhibiteur du cortisol sur la production d'IL-8 par des cellules épithéliales de l'endomètre bovin a récemment été observé (Dong et al., 2018).

En parallèle des effets sur la restriction, un résultat inattendu a été l'effet de la parité sur la production d'IL-8 par les CEM. Les CEM ont réagi de façon identique qu'elles soient incubées avec une solution témoin, E. Coli ou S. aureus. Du fait d'un taux d'exfoliation différent entre primipares et multipares il pourrait être supposé que la différence de production d'IL-8 pourrait provenir d'une variation du nombre de CEM incubées, or pour le challenge, 20 000 cellules étaient déposées par puits (Témoins, E. Coli, S. Aureus). Le même nombre pour chaque vache. La différence de réponse entre primipares et multipares n'est donc pas due à la concentration en CEM. Nous pouvons faire l'hypothèse que les CEM des primipares n'ont pas acquis une fonctionnalité complète du fait qu'elles n'ont pas été confrontées à des agents pathogènes lors d'une première lactation. Elles produiraient par conséquent moins d'IL-8.



## VI. Conclusion

La restriction alimentaire a entraîné une diminution de la production laitière et un changement de la composition du lait. Elle a eu tendance à entraîner une augmentation du taux d'exfoliation des CEM. Elle a provoqué des changements de concentration ioniques ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), de concentrations en lactose sanguin et en lactose dans le lait. Ces résultats suggèrent que la restriction alimentaire est associée à une perte d'intégrité de l'épithélium mammaire et à la mise en place d'une légère inflammation locale. La restriction alimentaire a eu un effet positif sur la réponse des cellules sanguines face à un challenge bactérien. Chez l'animal, cette réponse est nécessaire afin que l'organisme se « défende » contre l'agent pathogène, cependant une réponse trop forte peut entraîner des dommages tissulaires. Le challenge bactérien in-vitro s'il est pertinent à utiliser avec des cellules sanguines, ne semble pas convenir aux CEM isolées du lait. Ceci pourrait être expliqué par la perte de fonctionnalité des CEM lors du processus d'exfoliation ou de la purification. Le challenge bactérien in-vitro avec les CEM ne peut pas être validé. Le challenge in-vitro bactérien pourrait être testé avec des CEM issues de cultures de lignées afin de déterminer si la perte de fonctionnalité des CEM issues du lait a été à l'origine de l'absence de réponse. Afin de mettre en évidence les mécanismes régissant la variation de la réponse inflammatoire avec la restriction alimentaire, il pourrait être intéressant de doser le cortisol plasmatique dans les échantillons collectés lors de l'essai. Par ailleurs, les formules sanguines pourraient être étudiées afin de déterminer si la réaction des cellules sanguines au challenge inflammatoire provenait d'un changement du profil en cellules immunitaires. Enfin, le taux d'expression des récepteurs spécifiques aux agents pathogènes (TLR2 et TLR4) pourrait être dosé afin de déterminer la sensibilité des cellules sanguines et des CEM aux bactéries utilisées.

Dans le cas de notre étude, les résultats suggèrent que la restriction alimentaire n'a pas détérioré la santé des animaux. Ils n'ont pas perdu de poids et d'état corporel. La santé de la mamelle n'a pas non plus été affectée. Très peu de mammites se sont déclenchées (3 sur 54 animaux) durant la période de restriction. Les concentrations plasmatiques en haptoglobine sont restées faibles. Adapter l'alimentation en diluant la ration avec de la paille et en diminuant l'apport de concentrés ne semble donc pas nuire à la santé générale des animaux. Accepter des périodes de « sous-alimentation » apparaît être un moyen intéressant d'optimiser les coûts liés à l'alimentation, notamment dans les systèmes à bas intrants subissant des périodes de sécheresse.



## Références bibliographiques

- Abdelatty AM, Iwaniuk ME, Garcia M, Moyes KM, Teter BB, Delmonte P, Kadegowda AKG, Tony MA, Mohamad FF and Erdman RA 2017. Effect of short-term feed restriction on temporal changes in milk components and mammary lipogenic gene expression in mid-lactation Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 100, 4000-4013.
- Bannerman DD 2009. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *J Anim Sci* 87, 10-25.
- Barnes PJ 1998. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 94, 557-572.
- Barnes PJ 2010. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 120, 76-85.
- Ben Chedly H, Boutinaud M, Bernier-Dodier P, Marnet PG and Lacasse P 2010. Disruption of cell junctions induces apoptosis and reduces synthetic activity in lactating goat mammary gland. *J Dairy Sci* 93, 2938-2951.
- Bjerre-Harpoth V, Friggens NC, Thorup VM, Larsen T, Damgaard BM, Ingvarsten KL and Moyes KM 2012. Metabolic and production profiles of dairy cows in response to decreased nutrient density to increase physiological imbalance at different stages of lactation. *J Dairy Sci* 95, 2362-2380.
- Boutinaud M, Ben Chedly MH, Delamaire E and Guinard-Flament J 2008. Milking and feed restriction regulate transcripts of mammary epithelial cells purified from milk. *J Dairy Sci* 91, 988-998.
- Boutinaud M, Herve L and Lollivier V 2015. Mammary epithelial cells isolated from milk are a valuable, non-invasive source of mammary transcripts. *Front Genet* 6, 323.
- Ciliberti MG, Albenzio M, Inghese C, Santillo A, Marino R, Sevi A and Caroprese M 2017. Peripheral blood mononuclear cell proliferation and cytokine production in sheep as affected by cortisol level and duration of stress. *J Dairy Sci* 100, 750-756.
- Colitti M, Stradaoli G and Stefanon B 2005. Mammary cell turnover in lactating ewes is modulated by changes of energy fuels. *Res Vet Sci* 78, 53-59.
- Coulon J-B and Remond B 1991. Réponses de la production et de la composition du lait de vache aux variations d'apports nutritifs. *INRA Prod Anim* 4, 49-56.
- Descôteaux L 2004. La mammite clinique: stratégies d'intervention. Catalogue du Centre de Référence en Agriculture et Agroalimentaire du Québec.
- Dessaige F, Lollivier V, Ponchon B, Bruckmaier R, Finot L, Wiart S, Cutullic E, Disenhaus C, Barbey S and Boutinaud M 2011. Effects of nutrient restriction on mammary cell turnover and mammary gland remodeling in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 94, 4623-4635.
- Dong J, Qu Y, Li J, Cui L, Wang Y, Lin J and Wang H 2018. Cortisol inhibits NF-kappaB and MAPK pathways in LPS activated bovine endometrial epithelial cells. *Int Immunopharmacol* 56, 71-77.
- Drackley JK 1999. ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J Dairy Sci* 82, 2259-2273.
- Friggens NC, Emmans GC, Kyriazakis I, Oldham JD and Lewis M 1998. Feed intake relative to stage of lactation for dairy cows consuming total mixed diets with a high or low ratio of concentrate to forage. *J Dairy Sci* 81, 2228-2239.



- Fischer A 2017. Etude de la variabilité interindividuelle de l'efficacité alimentaire de la vache laitière. Thèse de Doctorat en Biologie et Agronomie. Sous la direction de Philippe FAVERDIN. Rennes. Agrocampus Ouest
- Gross J, van Dorland HA, Bruckmaier RM and Schwarz FJ 2011. Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation. *J Dairy Sci* 94, 1820-1830.
- Gross JJ, Schwarz FJ, Eder K, van Dorland HA and Bruckmaier RM 2013. Liver fat content and lipid metabolism in dairy cows during early lactation and during a mid-lactation feed restriction. *J Dairy Sci* 96, 5008-5017.
- Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA and Koopmans SJ 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B* 6, 1045-1056.
- Guinard-Flament J, Delamaire E, Lemosquet S, Boutinaud M and David Y 2006. Changes in mammary uptake and metabolic fate of glucose with once-daily milking and feed restriction in dairy cows. *Reprod Nutr Dev* 46, 589-598.
- Guinard-Flament J, Delamaire E, Lamberton P and Peyraud JL 2007. Adaptations of mammary uptake and nutrient use to once-daily milking and feed restriction in dairy cows. *J Dairy Sci* 90, 5062-5072.
- Gunther J, Liu S, Esch K, Schuberth HJ and Seyfert HM 2010. Stimulated expression of TNF-alpha and IL-8, but not of lingual antimicrobial peptide reflects the concentration of pathogens contacting bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* 135, 152-157.
- Herve L, Quesnel H, Lollivier V and Boutinaud M 2016. Regulation of cell number in the mammary gland by controlling the exfoliation process in milk in ruminants. *J Dairy Sci* 99, 854-863.
- Herve L, Quesnel H, Lollivier V, Portanguen J, Bruckmaier RM and Boutinaud M 2017. Mammary epithelium disruption and mammary epithelial cell exfoliation during milking in dairy cows. *J Dairy Sci* 100, 9824-9834.
- Herve L, Quesnel H, Veron M, Portanguen J, Gross J, Bruckmaier R and Boutinaud M 2018. Milk yield loss in response to feed restriction is associated with mammary epithelial cell exfoliation in dairy cows. Article soumis à *J Dairy Sci*.
- Humblet M-F, Godeau, J-M 2005. L'haptoglobine, marqueur protéique de l'inflammation aiguë dans l'espèce bovine. *Ann. Méd.Vét.*, 20-33.
- Humblet MF, Guyot H, Boudry B, Mbayahi F, Hanzen C, Rollin F and Godeau JM 2006. Relationship between haptoglobin, serum amyloid A, and clinical status in a survey of dairy herds during a 6-month period. *Vet Clin Pathol* 35, 188-193.
- Keogh K, Waters SM, Kelly AK, Wylie AR, Sauerwein H, Sweeney T and Kenny DA 2015. Feed restriction and realimentation in Holstein-Friesian bulls: II. Effect on blood pressure and systemic concentrations of metabolites and metabolic hormones. *J Anim Sci* 93, 3590-3601.
- Knudsen C, Combes S, Briens C, Duperray J, Rebours G, Salaun JM, Travel A, Weissman D, Gidenne T and Oswald IP 2015. Quantitative feed restriction rather than caloric restriction modulates the immune response of growing rabbits. *J Nutr* 145, 483-489.
- Loiselle MC, Ster C, Talbot BG, Zhao X, Wagner GF, Boisclair YR and Lacasse P 2009. Impact of postpartum milking frequency on the immune system and the blood metabolite concentration of dairy cows. *J Dairy Sci* 92, 1900-1912.
- Moyes KM, Drackley JK, Salak-Johnson JL, Morin DE, Hope JC and Looor JJ 2009. Dietary-induced negative energy balance has minimal effects on innate immunity during a *Streptococcus uberis* mastitis challenge in dairy cows during midlactation. *J Dairy Sci* 92, 4301-4316.



Noireterre P 2006. Suivis de comptages cellulaires et d'examens bactériologiques lors de mammites cliniques chez la vache laitière. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Lyon. Université Claude-Bernard - Lyon I.

Perkins KH, VandeHaar MJ, Burton JL, Liesman JS, Erskine RJ and Elsasser TH 2002. Clinical responses to intramammary endotoxin infusion in dairy cows subjected to feed restriction. *J Dairy Sci* 85, 1724-1731.

Rauw WM and Gomez-Raya L 2015. Genotype by environment interaction and breeding for robustness in livestock. *Front Genet* 6, 310.

Razavi Nematollahi L, Kitabchi AE, Stentz FB, Wan JY, Larijani BA, Tehrani MM, Gozashti MH, Omidfar K and Taheri E 2009. Proinflammatory cytokines in response to insulin-induced hypoglycemic stress in healthy subjects. *Metabolism* 58, 443-448.

Rupp R and Boichard D 1997. Evaluation génétique des bovins laitiers sur les comptages de cellules somatiques pour l'amélioration de la résistance aux mammites. In *Renc Rech Ruminants*.

Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM and Amaral FA 2014. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 10, 593-619.

Schukken YH, Gunther J, Fitzpatrick J, Fontaine MC, Goetze L, Holst O, Leigh J, Petzl W, Schuberth HJ, Sipka A, Smith DG, Quesnell R, Watts J, Yancey R, Zerbe H, Gurjar A, Zadoks RN and Seyfert HM 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol* 144, 270-289.

Sigl T, Meyer HH and Wiedemann S 2014. Gene expression analysis of protein synthesis pathways in bovine mammary epithelial cells purified from milk during lactation and short-term restricted feeding. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 98, 84-95.

Stelwagen K, Davis SR, Farr VC, Prosser CG and Sherlock RA 1994. Mammary epithelial cell tight junction integrity and mammary blood flow during an extended milking interval in goats. *J Dairy Sci* 77, 426-432.

Ster C, Loiselle MC and Lacasse P 2012. Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. *J Dairy Sci* 95, 708-717.

Thompson GE 1996. Cortisol and regulation of tight junctions in the mammary gland of the late-pregnant goat. *J Dairy Res* 63, 305-308.

Turner MD, Nedjai B, Hurst T and Pennington DJ 2014. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 1843, 2563-2582.

Villard S 2017. Les infections mammaires chez la vache laitière. Démarche dans le cadre du diagnostic collectif. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Lyon. Université Claude-Bernard - Lyon I.



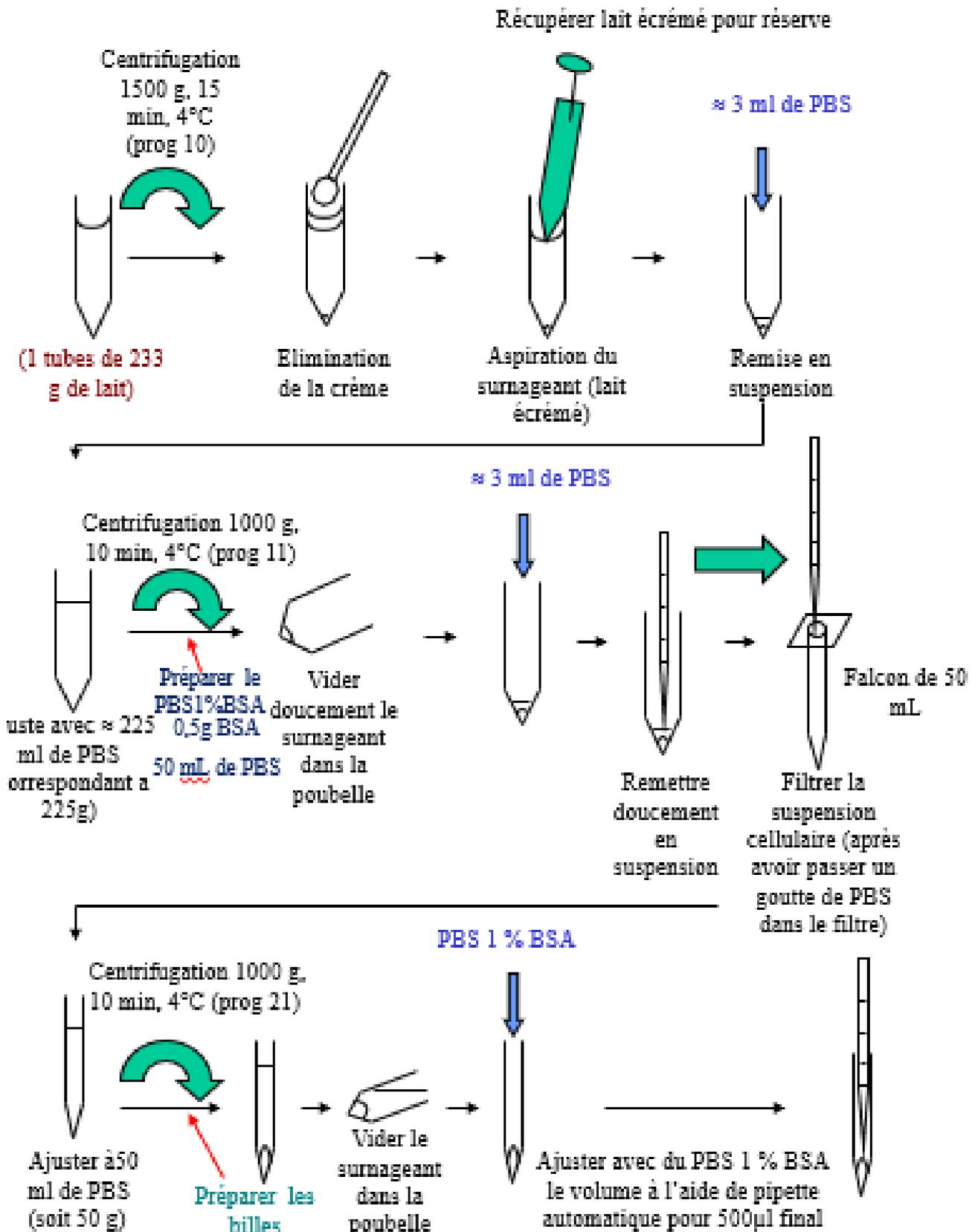
Annexe 1 : Liste des animaux de l'essai 1804 (numéro, rang de lactation, date au vêlage)

Numéro vache	Numéro de Lactation	Date de vêlage
272	1	03/10/17
275	6	20/09/17
277	2	30/09/17
288	6	19/09/17
2359	4	11/09/17
2374	3	17/09/17
2394	4	13/09/17
2433	4	21/09/17
2451	3	16/09/17
2459	1	14/09/17
3402	3	09/09/17
3408	3	21/09/17
3443	3	05/09/17
3475	3	18/09/17
3551	6	03/10/17
3558	2	27/09/17
4253	2	03/10/17
4258	2	12/09/17
4263	2	05/09/17
4266	2	20/09/17
4269	2	20/09/17
4276	2	11/09/17
4290	2	03/10/17
4291	2	23/09/17
4295	2	20/09/17
5203	1	05/09/17
5207	1	05/09/17
5209	1	23/09/17
5212	1	14/09/17
5214	1	05/09/17
5215	1	05/09/17
5216	1	17/09/17
5217	1	11/09/17
5219	1	09/09/17
5220	1	02/09/17
5222	1	09/09/17
5225	1	09/09/17
5228	1	12/09/17
5235	1	31/08/17

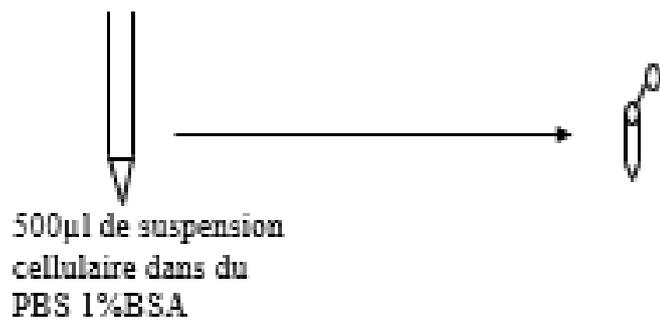
5237	1	05/09/17
5238	6	30/09/17
5239	1	05/09/17
5240	1	09/09/17
5241	1	13/09/17
5243	1	15/09/17
5245	1	03/09/17
5249	1	12/09/17
5263	1	26/09/17
5280	1	27/09/17
5288	1	19/09/17
5299	1	11/09/17
5303	1	15/09/17
5311	3	28/09/17
5333	1	26/09/17



## Annexe 2 : Protocole de purification des cellules épithéliales mammaires issues du lait

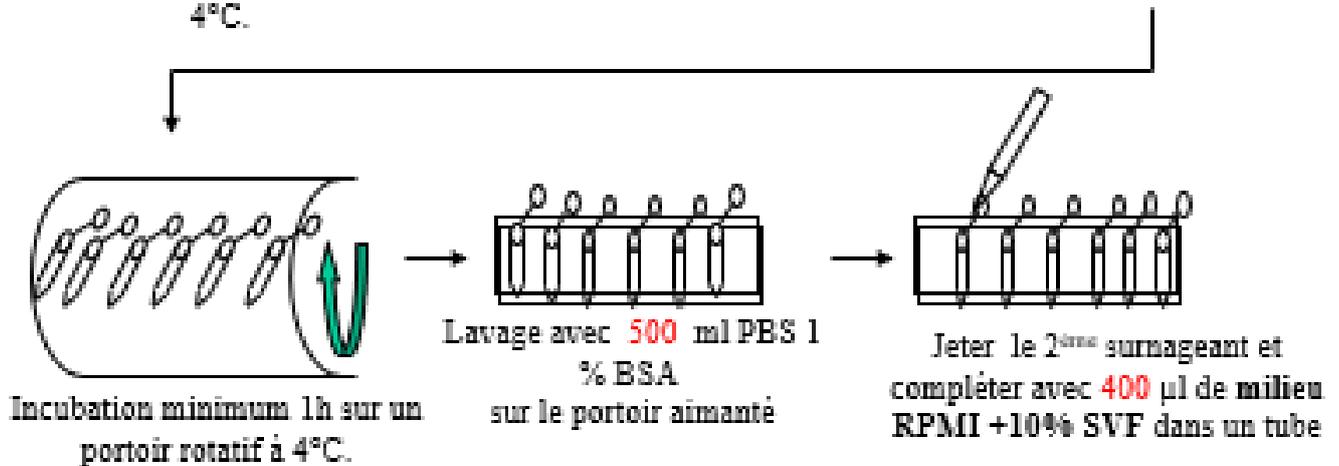
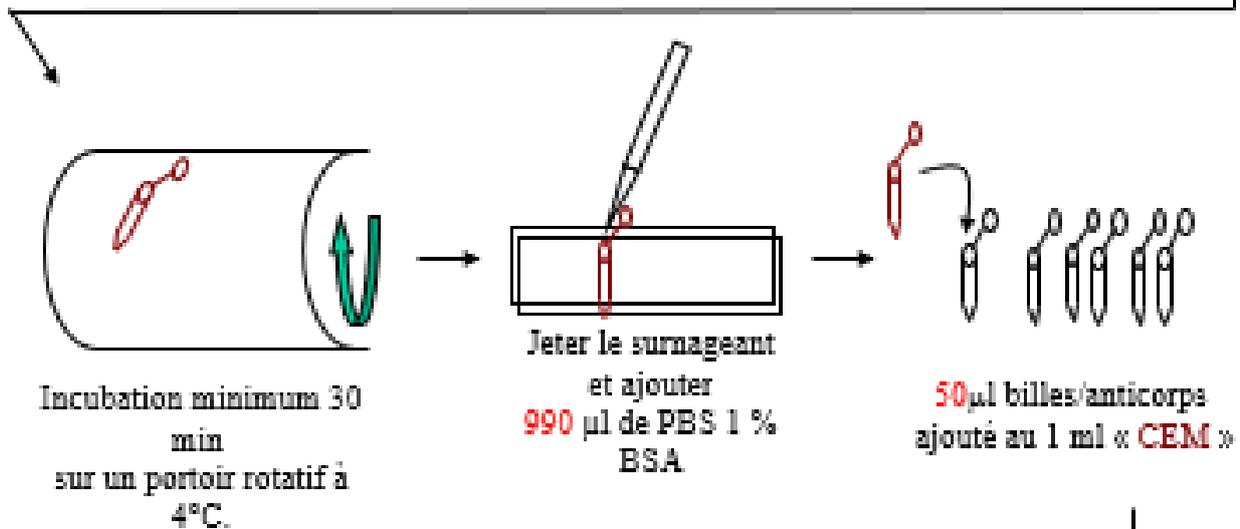
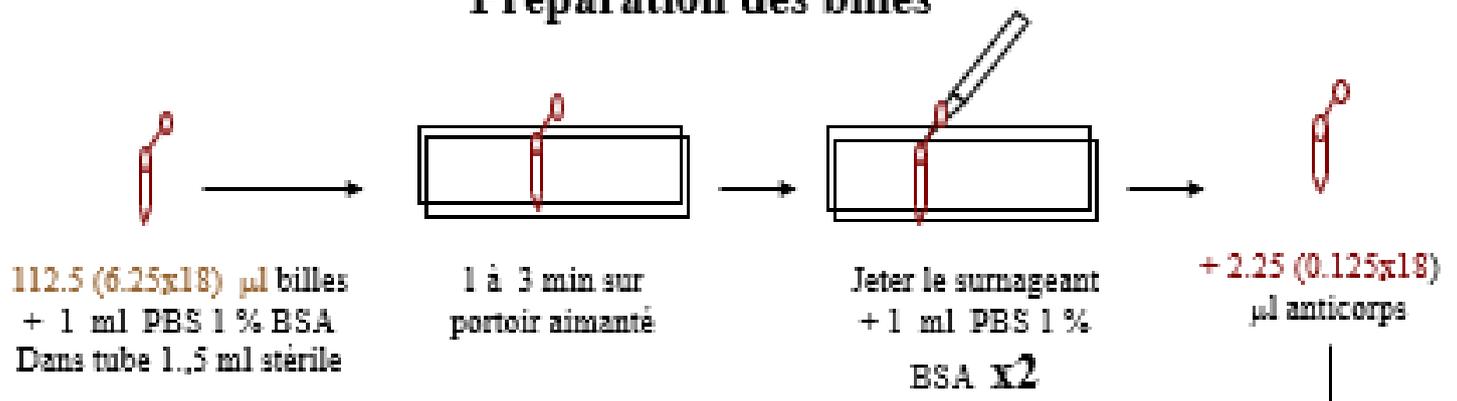




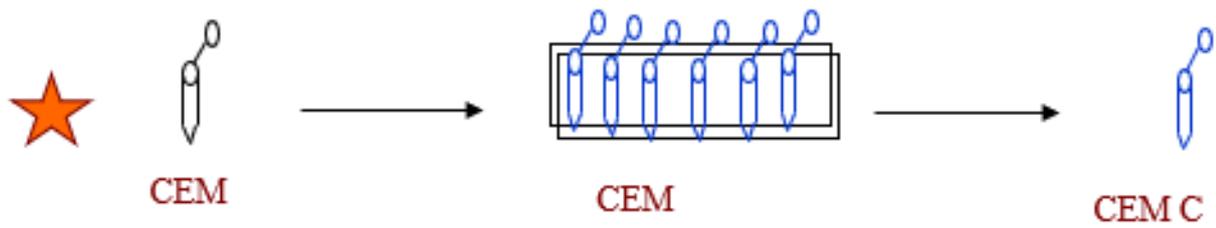


- le restant dans un tube 1 ml stérile  
Essai **CEM**, numvache, date

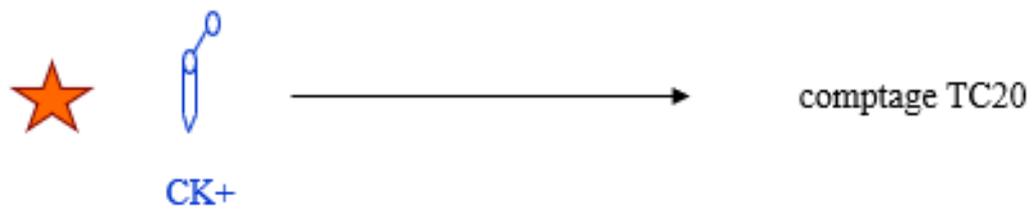
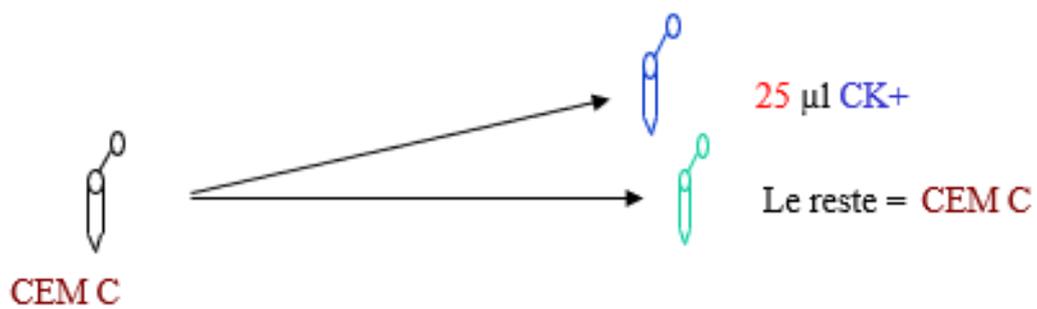
## Préparation des billes







Mélanger les tube à la pipette, les poser sur le portoir aimanté  
 reprendre les surnageant et le déposer dans un nouveau tube CK+C

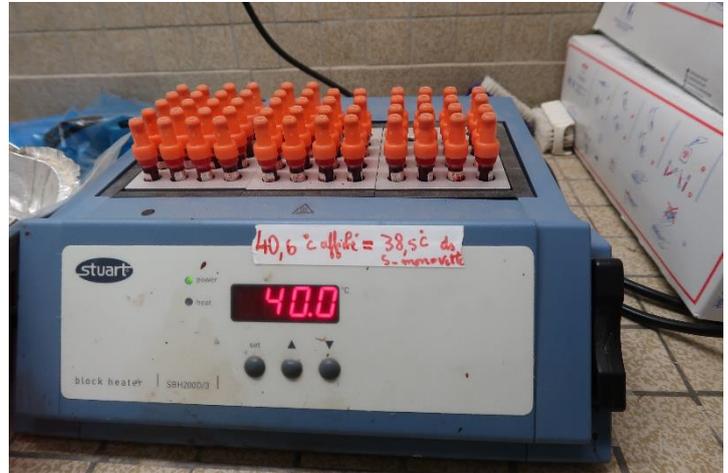




### Annexe 3 : Photos des dispositifs de prélèvements sanguins et du matériel d'incubation



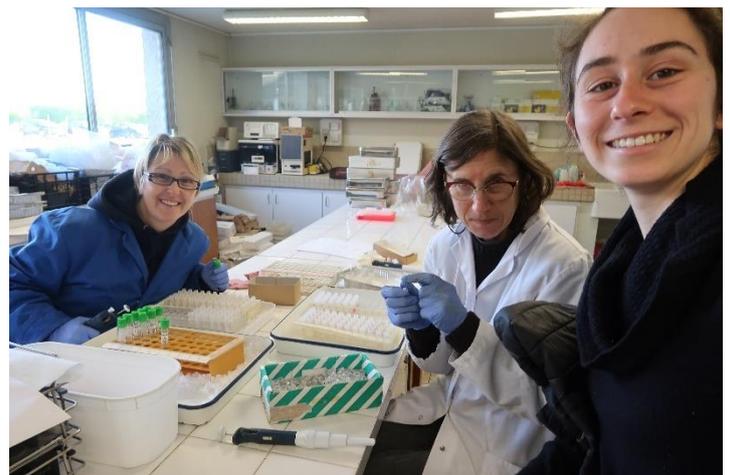
Remplissage des monovettes après réalisation d'une prise de sang



Bain à sec contenant des monovettes en cours d'incubation



Remplissage des vacutainers après prises de sang



Aliquotage du plasma de bovin



## Annexe 4 : Tableaux complémentaires, effet de la semaine sur les paramètres zootechniques, cellulaires, inflammatoires et métaboliques

Tableau A : Score en cellules somatiques (SCS), quantité de cellules somatiques, taux de cellules épithéliales mammaires (CEM) et quantité de cellules épithéliales mammaires exfoliées par jour chez des vaches laitières Prim Holstein (n=54) selon la semaine d'expérimentation (moyenne  $\pm$  SEM). Semaine -1 et -2 les animaux ont reçu un régime alimentaire standard, semaine 1, 2 et 5 les animaux ont reçu un régime alimentaire restreint.

	Semaine	Semaine	Semaine	Semaine	Semaine	SEM	p-value		
	- 2	- 1	1	2	5		Semaine	Parité	Santé
<b>SCS</b>	1.78 <sup>b</sup>	1.72 <sup>b</sup>	1.98 <sup>a</sup>	1.93 <sup>a</sup>	2.04 <sup>a</sup>	0.184	0.01*	0.0009 ***	0.78
<b>Quantité de cellules somatiques (x 10<sup>3</sup> cell/j)</b>	2720	2930	2482	2770	2952	592.1	0.92	0.001 **	0.93
<b>CEM (x 10<sup>3</sup> cell/mL lait)</b>	4.99 <sup>c</sup>	6.61 <sup>b</sup>	7.93 <sup>b</sup>	9.20 <sup>b</sup>	13.48 <sup>a</sup>	2.781	0.002**	0.0004 ***	0.58
<b>Quantité de CEM exfoliées (x 10<sup>6</sup> cell/j)</b>	17.3 <sup>e</sup>	21.1 <sup>d</sup>	25.2 <sup>c</sup>	30.4 <sup>b</sup>	42.3 <sup>a</sup>	0.55	0.08 .	<0.0001***	0.39



Tableau B : Concentration en IL-8 dans le plasma ou dans le surnageant de culture de cellules épithéliales mammaires de vaches Prim Holstein (n=54) en fonction de la semaine d'expérimentation et du milieu d'incubation (solution témoin, solution contenant des bactéries tuées, *Escherichia Coli* ou *Staphylococcus Aureus*). Semaine -1 et -2 les animaux ont reçu un régime alimentaire standard, semaine 1, 2 et 5 les animaux ont reçu un régime alimentaire restreint.

		Semaine	Semaine	Semaine	Semaine	Semaine	SEM	p-value					
		-2	-1	1	2	5		Semaine	Bactérie	Parité	Santé	Semaine*Bactérie	
<b>IL-8 sang (ng/mL)</b>	contrôle	2.16 <sup>g</sup>	1.28 <sup>g</sup>	1.16 <sup>g</sup>	1.03 <sup>g</sup>	1.08 <sup>g</sup>	7.785						
	E.coli	101.75 <sup>f</sup>	116.54 <sup>e</sup>	125.62 <sup>d</sup>	155.39 <sup>b</sup>	144.15 <sup>c</sup>	7.785	1.00	<0.0001***	0.50	0.79	<0.0001***	
	S.Aureus	99.84 <sup>f</sup>	114.52 <sup>e</sup>	124.60 <sup>d</sup>	114.11 <sup>e</sup>	192.54 <sup>a</sup>	7.785						
<b>IL-8 CEM (ng/mL)</b>	Contrôle	0.87	1.112	1.32	1.35	0.77	0.187						
	E.coli	0.64	0.97	1.09	1.06	0.63	0.187	0.03 *	0.06	<0.0001***	0.26	0.43	
	S.Aureus	0.73	1.20	1.29	1.13	0.62	0.187						

Tableau C : Concentrations en métabolites plasmatiques de vaches laitières Prim Holstein (n=54) en fonction de la semaine d'expérimentation (moyenne ± SEM). Semaine -1 et -2 les animaux ont reçu un régime alimentaire standard, semaine 1, 2 et 5 les animaux ont reçu un régime alimentaire restreint.

Plasma sanguin	Semaine - 2	Semaine - 1	Semaine 1	Semaine 2	Semaine 5	SEM	p-value		
							Semaine	Parité	Santé
<b>Urée (mg/l)</b>	395.4 <sup>a</sup>	387.3 <sup>a</sup>	248.4 <sup>b</sup>	263.3 <sup>b</sup>	211.3 <sup>c</sup>	16.21	<0.0001***	0.56	0.08
<b>AGNE (µmol/l)</b>	141.5	146.6	165.5	136.9	131.0	18.28	0.70	0.45	0.59
<b>Glucose (mg/l)</b>	667.5 <sup>a</sup>	659.7 <sup>a</sup>	612.1 <sup>c</sup>	615.3 <sup>c</sup>	638.5 <sup>b</sup>	8.46	<0.0001***	0.23	0.44
<b>B-OH (µmol/l)</b>	657.1 <sup>a</sup>	674.6 <sup>a</sup>	605.7 <sup>b</sup>	592.9 <sup>b</sup>	602.8 <sup>b</sup>	26.81	0.05 *	0.86	0.64
<b>Lactose (mg/l)</b>	30.8 <sup>c</sup>	29.6 <sup>c</sup>	31.8 <sup>b</sup>	33.2 <sup>b</sup>	35.8 <sup>a</sup>	1.45	<0.0001***	0.003**	0.66
<b>Haptoglobine (mg/ml)</b>	107.1	121.7	120.2	109.1	91.1	16.26	0.49	0.03 *	0.97



Tableau D : Concentrations en lactose dans le lait, sodium et potassium de vaches laitières Prim Holstein (n=54) en fonction de la semaine d'expérimentation (moyenne  $\pm$  SEM). Semaine -1 et -2 les animaux ont reçu un régime alimentaire standard, semaine 1, 2 et 5 les animaux ont reçu un régime alimentaire restreint.

	Semaine - 2	Semaine - 1	Semaine 1	Semaine 2	Semaine 5	SEM	p-value		
							Semaine	Parité	Santé
<b>Lactose lait journalier (g/kg)</b>	49.8 <sup>a</sup>	49.9 <sup>a</sup>	49.8 <sup>ab</sup>	49.4 <sup>b</sup>	49.5 <sup>b</sup>	0.21	<0.0001***	0.29	0.97
<b>Lactose lait matin (g/kg)</b>	49.6 <sup>ab</sup>	49.7 <sup>a</sup>	49.6 <sup>ab</sup>	49.2 <sup>c</sup>	49.4 <sup>bc</sup>	0.22	0.002**	0.30	0.93
<b>Lactose lait soir (g/kg)</b>	50.1 <sup>a</sup>	50.2 <sup>a</sup>	49.9 <sup>ab</sup>	49.6 <sup>c</sup>	49.7 <sup>bc</sup>	0.22	<0.0001***	0.28	0.89
<b>Na<sup>+</sup> (g/kg)</b>	312.6 <sup>b</sup>	305.5 <sup>c</sup>	318.1 <sup>b</sup>	323.1 <sup>a</sup>	325.7 <sup>a</sup>	5.70	<0.0001***	0.0004***	0.46
<b>K<sup>+</sup> (g/kg)</b>	1730.6 <sup>a</sup>	1720.8 <sup>a</sup>	1662.8 <sup>c</sup>	1688.9 <sup>b</sup>	1671.8 <sup>c</sup>	14.78	<0.0001***	0.03*	0.30
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (%)</b>	18.2 <sup>b</sup>	17.9 <sup>b</sup>	19.3 <sup>a</sup>	19.3 <sup>a</sup>	19.6 <sup>a</sup>	0.41	<0.0001***	0.0002***	0.33





	Diplôme : ingénieur agronome Spécialité : Science et ingénierie des productions animales Spécialisation / option: \ Enseignant référent : Pierre-Guy Marnet
Auteur(s) : Elisa Arnaud	Organisme d'accueil : INRA (institut National de Recherche Agronomique)
Date de naissance* :31/05/1995	Adresse :
Nb pages : 23 Annexe(s) :8 pages	INRA, 16 Le Clos
Année de soutenance : 2018	35 590 Saint-Gilles Maître de stage : Marion Boutinaud, Jocelyne Flament
Titre français : Effet d'une restriction alimentaire sur la santé des vaches laitières	
Titre anglais : Effect of feed restriction on dairy cows health	
Résumé (1600 caractères maximum) :	
<p>Chez la vache laitière, la restriction alimentaire est connue pour entraîner une réduction de la production laitière, des modifications de la composition du lait et affecter le métabolisme mammaire. L'objectif de l'étude a été d'examiner le lien entre restriction alimentaire et santé de la mamelle. Cinquante-quatre vaches de race Prim'Holstein ont reçu un régime alimentaire standard durant 2 semaines puis ont été restreintes durant 5 semaines. La production laitière et la température ruminale ont été enregistrées. Des échantillons de lait et de sang ont été collectés. Les cellules épithéliales mammaires (CEM) ont été purifiées à partir du lait et confrontées à un challenge bactérien. Elles ont été mises en cultures avec une solution saline, Escherichia Coli ou Staphylococcus Aureus. Le sang a également été soumis au challenge bactérien. Les concentrations en Interleukines 8 produites lors du challenge ont été mesurées. Une interaction entre le régime alimentaire et la bactérie a pu être mise en évidence dans le plasma. Un régime alimentaire restreint entraîne une plus forte production d'IL-8 lorsque le sang est mis en culture avec une des deux bactéries. Le challenge n'a pas fonctionné pour les CEM. La restriction alimentaire a affecté l'intégrité de l'épithélium mammaire en favorisant l'ouverture des jonctions serrées.</p>	
Abstract (1600 caractères maximum) :	
<p>In dairy cows, feed restriction is known to decrease milk yield, protein yield and to influence udder metabolism. This study aimed to examine the link between feed restriction and health in dairy cows. Fifty-four Prim'Holstein received a standard feeding for 2 weeks and then were fed a restricted diet for 5 weeks. Milk production and internal temperature were recorded. Blood and milk sample were collected. Mammary epithelial cells (MEC) were purified from milk and used in a bacterial challenge. MEC were incubated with a saline solution, Escherichia Coli or Staphylococcus Aureus. Blood was used in a bacterial challenge too. The Concentration of interleukin 8 produced during the challenge was measured. Feed restriction decreased milk yield, fat yield and protein yield. In the blood, feed restriction induced a higher production of IL-8 after bacterial challenge. The bacterial challenge did not work with MEC. Feed restriction also affected the integrity of udder epithelium by opening tight junctions.</p>	
Mots-clés : Restriction alimentaire, vaches laitières, santé, inflammation, challenge bactérien	
Key Words: Feed restriction, dairy cows, immune system, bacterial challenge	

\* Élément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires