

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

Orientation : Médecine vétérinaire

Titre de la thèse en français : Dosages de marqueurs biochimiques et identification de mécanismes moléculaires impliqués dans la persistance de la mammite bovine

Titre de la thèse en anglais : Biochemical markers quantification and identification of molecular mechanisms implicated in the persistence of bovine mastitis

Candidat : Philippe Boutet

Promoteur : Prof. Pierre Lekeux

Département et Service : Département des Sciences fonctionnelles, service de Physiologie

Date de la défense publique : le 31 janvier 2006

Composition du Jury : *Membres extérieurs à la Faculté :*
C. Burvenich (Ughent) , B. Poutrel (INRA, Tours)
Membres internes à la faculté de Médecine vétérinaire :
P. Lekeux, J.F. Beckers, P. Gustin, F. Bureau, J.M. Godeau, F. Rollin, C. Hanzen, J. Detilleux

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Lorsqu'une bactérie pathogène pénètre dans le pis de la vache, différents mécanismes inflammatoires et immunitaires s'activent afin d'éradiquer l'agresseur de façon optimale. Cette réaction inflammatoire est appelée mammite.

La mamelle bovine est protégée par des mécanismes de défense qui reposent essentiellement sur l'activité de différentes cellules capables de migrer du sang vers la glande mammaire lorsqu'une infection se déclare. Lors d'infection, si la première ligne de défense essentiellement représentée par le polymorphonucléaire neutrophile permet d'éliminer le pathogène, le recrutement de ces cellules s'arrête et le taux cellulaire du lait redescend alors progressivement (Burvenich *et al.*, 1994). Par contre si la bactérie

résiste, l'inflammation persiste et la migration cellulaire continue. Le taux cellulaire du lait est dès lors augmenté, ce qui engendre des pénalités financières aux producteurs.

L'élévation persistante du taux cellulaire du lait provoque une diminution de la quantité et la qualité du lait produit. L'évolution chronique fréquente de la mammite à *Staphylococcus aureus* pose de sérieux problèmes économiques à toute la filière laitière, mais concerne également la santé publique. En effet, l'utilisation massive de l'antibiothérapie dans le traitement et le contrôle de la mammite augmente les risques d'introduire dans la chaîne alimentaire des souches résistantes à certains antibiotiques et de disperser des microorganismes zoonotiques via notamment les produits laitiers non pasteurisés (Bradley, 2002).

Dès lors, afin d'identifier de nouvelles

alternatives thérapeutiques, l'objectif de ce travail a été consacré à l'étude de mécanismes physiopathologiques pouvant expliquer la persistance de taux cellulaires élevés dans le lait. Dans la première étude, nous avons tenté de répondre à la question suivante : la persistance d'un haut taux cellulaire dans le lait est-elle due, du moins en partie, à un déséquilibre local entre médiateurs pro- et anti-inflammatoires ? Dans la deuxième étude, nous avons cherché à mieux préciser l'importance des lipoxines, molécules endogènes aux propriétés anti-inflammatoires uniques, dans le cadre de la résolution de la mammite. La cinétique d'apparition de médiateurs pro- et anti-inflammatoires a été évaluée de façon concomitante à des paramètres systémiques et locaux, et ce de l'initiation à la résolution d'une infection aiguë. La troisième étude a

été consacrée à mieux caractériser le rôle de la prolactine (PRL) dans la réaction inflammatoire mammaire. La PRL est en effet fortement augmentée au moment du vêlage, période caractérisée par une forte incidence de mammites cliniques sévères. Finalement, dans la dernière étude, nous avons cherché à évaluer le rôle que pouvait jouer un autre phénomène intervenant dans l'accumulation des neutrophiles au site inflammatoire, à savoir le délai de leur entrée en apoptose, définie comme une mort cellulaire programmée. Les questions que nous nous sommes posées étaient : 1) Les neutrophiles retrouvés dans le lait présentent-ils un retard d'apoptose chez les vaches dont le taux cellulaire est élevé de façon persistante ? 2) Dans l'affirmative, est-il possible d'inverser ce mécanisme afin d'empêcher ces cellules de produire des médiateurs qui pourraient amplifier et perpétuer la cascade inflammatoire ?

RÉSULTATS

Dans la première étude, nous avons émis l'hypothèse que l'inflammation chronique de la mamelle pouvait être associée à un rapport défavorable entre le leucotriène (LT) B₄ et la lipoxine (LX) A₄ et que la persistance de l'accumulation des neutrophiles pouvait être due à une augmentation de la synthèse de LTB₄ et/ou à un défaut de production de LXA₄. En effet, alors que LTB₄ est un puissant attracteur des neutrophiles, LXA₄ s'oppose aux réponses induites par celui-ci en inhibant la migration des neutrophiles vers le site inflammatoire. L'équilibre entre la formation des LT et des LX est donc critique pour les réponses cellulaires. Les concentrations en LTB₄ et LXA₄ ont été mesurées dans le lait de vaches saines et souffrant de mammite aiguë ou chronique. Le

rapport individuel entre LXA₄ et LTB₄ a été calculé dans les différents types de quartiers. Il ressort de cette étude que le taux de LTB₄ était bas dans les quartiers sains, fortement élevé dans les quartiers atteints de mammite aiguë, et intermédiaire dans les quartiers chroniques. Par contre, alors que les taux de LXA₄ étaient significativement augmentés dans la mammite aiguë, les quartiers sains et atteints de mammites chroniques présentaient des concentrations faibles. La moyenne des rapports LXA₄:LTB₄ individuels était donc significativement plus faible dans les quartiers chroniques que dans les quartiers sains et atteints de mammite aiguë. Ces résultats montrent l'existence d'un déséquilibre entre les eicosanoïdes LXA₄ et LTB₄ chez les vaches atteintes de mammites chroniques à cause des faibles concentrations en LXA₄. Ces faibles taux de LXA₄ pourraient participer à la persistance de l'inflammation chez ces animaux.

Le but de la deuxième étude était donc de mieux préciser l'importance de ce médiateur dans la résolution de la mammite bovine. La génération au cours du temps des eicosanoïdes PGE₂, LTB₄ et LXA₄ a été analysée lors d'une réponse inflammatoire aiguë induite par l'inoculation intramammaire d'*Escherichia coli*. Ce modèle expérimental infectieux présente l'intérêt de se résoudre spontanément. Un examen clinique approfondi et le dosage des médiateurs dans le sang et le lait de quartiers infectés ont été réalisés avant l'inoculation et par la suite à intervalles réguliers de 3 à 144 heures. Dans le sang, l'évolution des trois eicosanoïdes au cours du temps s'est montrée similaire, diminuant rapidement suite à l'inoculation d'*E. coli*. Par contre, le rapport individuel LXA₄:LTB₄ a augmenté simultanément à l'amélioration

clinique, estimée notamment par la diminution de la température rectale. Dans le lait, le LTB₄ a été le premier à augmenter et son pic de concentration, 3 heures après l'inoculation, a précédé la valeur maximum du taux cellulaire du lait. Ensuite, PGE₂ a augmenté et sa concentration a varié entre 3 et 18 heures post-inoculation, pour finalement diminuer graduellement. LXA₄ a augmenté plus tardivement atteignant un pic de concentration 24 heures après l'inoculation. C'est à ce moment que le rapport individuel LXA₄:LTB₄ atteignait une valeur maximale significative. A partir de 24 heures post-infection, une diminution graduelle du nombre de bactéries et du taux cellulaire a été observée jusque la fin de l'étude. Ces résultats montrent que les valeurs maximales des rapports individuels LXA₄:LTB₄ aussi bien du sang que du lait sont suivies respectivement d'une amélioration systémique et locale.

La troisième étude a été consacrée à déterminer l'influence que pourrait avoir la PRL sur la réaction inflammatoire mammaire. Grâce à l'utilisation d'une lignée de cellules épithéliales mammaires bovines, il a pu être démontré *in vitro* que la PRL était capable d'activer le facteur nucléaire κB (NF-κB), un facteur clé dans la réponse inflammatoire. La PRL a également permis d'augmenter l'expression de différents médiateurs de l'inflammation dépendant de NF-κB dans les cellules épithéliales mammaires bovines. Il ressort également de cette étude qu'une corrélation positive existe entre les concentrations en PRL mesurées dans le lait et le taux cellulaire d'un quartier. Par conséquent, la PRL agirait donc plutôt comme un facteur aux propriétés pro-inflammatoires dans les cellules épithéliales mammaires.

L'accumulation persistante de cellules inflammatoires au site infectieux nécessite d'une part un afflux permanent de neutrophiles, et d'autre part une augmentation de leur survie, définie comme un retard de leur entrée en apoptose, l'apoptose étant une mort cellulaire programmée. Cette dernière étude a donc été réalisée dans le but d'évaluer par des études *in vitro* l'éventuel retard d'apoptose de neutrophiles isolés de lait d'animaux présentant des taux cellulaires élevés de façon persistante. Un retard d'apoptose pourrait en effet permettre aux neutrophiles de sécréter des médiateurs capables d'amplifier et perpétuer la réaction inflammatoire. Parmi les nombreux médiateurs inflammatoires capables de réguler la durée de vie des neutrophiles humains, le *granulocyte/macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) contribue largement à l'inhibition de l'apoptose des granulocytes au site inflammatoire et pourrait dès lors participer à l'accumulation de ces cellules au site infectieux de nombreuses maladies. Dans un premier temps, nous avons testé si le GM-CSF était capable de retarder l'entrée en apoptose de neutrophiles bovins isolés de sang de vaches saines. Ces expériences ont montré que ce médiateur retardait significativement l'apoptose des neutrophiles bovins. Dans ces cellules, le GM-CSF activait le facteur de transcription STAT5 et provoquait l'augmentation de l'ARN messager de Bcl-x_L, un membre anti-apoptotique de la famille Bcl2. L'utilisation d'un inhibiteur, le tyrphostin AG-490, a empêché l'activation de STAT5 et la surexpression de Bcl-x_L, supprimant tout effet anti-apoptotique du GM-CSF. Dans un second temps, des neutrophiles ont été isolés du lait de vaches présentant une élévation persistante du taux de cellules somati-

ques. Ces cellules ont présenté un retard d'apoptose en culture en comparaison de neutrophiles isolés de lait de quartiers sains et n'ont pas présenté de délai d'apoptose supplémentaire après traitement au GM-CSF. De plus, des complexes STAT5 actifs ont été détectés dans ces cellules. Dans un troisième temps, le tyrphostin a permis de déclencher *ex vivo* l'apoptose des neutrophiles isolés de lait à hauts taux cellulaires.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La guérison d'une vache souffrant d'une mammite d'origine bactérienne repose sur l'équilibre entre l'élimination de l'agent infectieux et la résolution de la réponse inflammatoire, étapes toutes deux indispensables au retour d'une composition normale du lait et d'un faible taux cellulaire. Le recrutement rapide de neutrophiles en nombre suffisant vers la glande mammaire est un moyen primordial en début d'infection pour éliminer l'agent pathogène et permettre la résolution de la mammite. Suivant la virulence du pathogène impliqué et l'intensité de la réponse inflammatoire de l'hôte, le temps nécessaire à la diminution du taux cellulaire, une fois l'agent infectieux éliminé, est de quelques jours, semaines, voire plus encore (Harmon, 1994). Cette observation montre qu'infection et inflammation, bien que liées lors de l'initiation de la réponse immune mammaire, finissent par se dissocier. De plus, les infections subcliniques et chroniques de la glande mammaire, et particulièrement celles à *S. aureus*, se caractérisent par une fluctuation du SCC et de la réponse inflammatoire au cours du temps (Sears *et al.*, 1990 ; Riollet *et al.*, 2001). Hormis la virulence du pathogène impliqué, quelles pourraient être les raisons expliquant la persistance de la réaction inflamma-

toire chez certaines vaches ?

La mammite chronique se caractérise par une accumulation persistante de cellules dans le lait, le neutrophile étant le type prédominant, dont la principale conséquence est la diminution de la production laitière. Les mécanismes de la résolution de l'inflammation permettent, entre autres, de stopper la migration des neutrophiles et empêchent ainsi leurs effets néfastes et destructeurs sur les tissus qui se développent lorsque le phénomène persiste. Ces mécanismes primordiaux à la guérison ont été très peu étudiés dans le cadre de la mammite bovine.

Il ressort de ce travail que la mammite chronique semble se caractériser par une activité neutrophilique permanente mais insuffisante pour éradiquer le germe infectieux. Cette activité neutrophilique serait due, notamment, à une viabilité accrue induite par des cytokines pro-inflammatoires, comme par exemple le GM-CSF. Ce retard d'apoptose permettrait ainsi aux neutrophiles d'exercer leur rôle de cellule immunorégulatrice en sécrétant diverses cytokines capables d'amplifier et perpétuer la réaction inflammatoire. Par ailleurs, la persistance de l'inflammation dans la mammite chronique pourrait être liée à des concentrations trop faibles en LX. Ces faibles niveaux pourraient dépendre de l'intensité de la réponse inflammatoire, trop faible dans la mammite chronique que pour favoriser l'orientation de l'activité cellulaire vers la synthèse de LX (orientation vers une activité 15-lipoxygénase). La mammite chronique se caractériserait par conséquent par une activité cellulaire orientée majoritairement vers la synthèse d'eicosanoïdes pro-inflammatoires, comme le LTB₄ (orientation vers une activité 5-lipoxygénase).

Des études ultérieures devraient permettre de clairement élucider les

mécanismes expliquant les faibles concentrations en LXA_4 retrouvées dans le lait des quartiers chroniques et déterminer si l'administration d'analogues stables de LXA_4 présente un intérêt thérapeutique dans le traitement de la mammite chronique bovine. Il reste encore à démontrer si l'orientation de la réaction inflammatoire vers la synthèse de LX ne dépend pas directement de la virulence du germe pathogène et donc indirectement de l'intensité de la réponse inflammatoire qu'il suscite. La deuxième étude de ce travail a précisé que les améliorations systémique et locale suivaient les rapports $LXA_4:LTB_4$ les plus élevés, suggérant un rôle clé pour LXA_4 dans la résolution de la mammite. Il apparaît dès lors primordial de réaliser ce même genre d'étude dans un modèle d'inflammation subclinique à évolution chronique induite par une souche bien caractérisée de *Staph. aureus*.

La plupart des gènes codant pour des protéines inflammatoires impliquées dans la migration et l'activation des neutrophiles dépendent en partie du facteur de transcription NF- κ B pour leur activation (Pahl, 1999). Un grand nombre de bactéries peuvent directement activer NF- κ B dans les cellules épithéliales et les macrophages, ce qui déclenche la réponse inflammatoire (Zhang et Ghosh, 2000). Les cellules épithéliales et les macrophages activés sécrètent alors des cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α , potentiellement activatrices de NF- κ B dans les cellules présentes au site infectieux comme les neutrophiles (Sharma *et al.*, 1998). Cette activité de NF- κ B dans les neutrophiles provoque la libération de médiateurs, qui vont à leur tour amplifier la réaction inflammatoire.

La troisième étude de ce travail a apporté des précisions sur le rôle que

pourrait jouer la PRL dans la mammite bovine. Il apparaît que la PRL bovine est capable d'activer NF- κ B et provoque de façon dose-dépendante la surexpression de cytokines pro-inflammatoires sous la dépendance de ce facteur de transcription dans une lignée de cellules épithéliales mammaires bovines. Les fortes concentrations en PRL retrouvées dans le lait après la parturition pourrait dès lors expliquer, du moins partiellement, le caractère aigu de la réaction inflammatoire qui se développe particulièrement à ce moment là. De plus, la corrélation positive qui existe entre la concentration en PRL mesurée dans le lait et le taux cellulaire d'un quartier pourrait participer au caractère pro-inflammatoire associé à la persistance des neutrophiles dans les quartiers infectés.

NF- κ B est impliqué dans la physiopathologie de maladies inflammatoires chroniques, telles que l'asthme, et son activité est maintenue à un niveau modéré ou élevé dans les bronches de chevaux poussifs au moins 21 jours après l'éviction de l'allergène de leur environnement (Bureau *et al.*, 2000a). Ce maintien d'activité dépendrait de l'interaction entre les granulocytes et les cellules épithéliales bronchiques via la rétroaction de boucles autoactivatrices dépendantes de l'IL-1 β et du TNF- α . Cette activité ne s'arrêterait qu'après la mort des granulocytes (Bureau *et al.*, 2000b). L'ensemble de ces observations suggère que ces neutrophiles actifs au site inflammatoire seraient capables d'entretenir l'inflammation via l'activation de NF- κ B, et que son activité pourrait également se maintenir un certain temps dans la glande mammaire, même après l'éradication du germe pathogène. Il peut être supposé aussi que seules la mort et la clairance des neutrophiles per-

mettraient de stopper les effets directs et indirects de ces cellules sur la réponse inflammatoire présente dans la mamelle.

A l'avenir, la connaissance plus approfondie des mécanismes d'interaction entre la bactérie et l'hôte ouvrira de nouvelles perspectives dans le développement de stratégies immunomodulatrices nécessaires à la prévention ou au traitement de la mammite bovine. Ainsi, suivant le germe pathogène impliqué, il serait utile de savoir si les neutrophiles sont hypo- ou hyper-fonctionnels, afin de déterminer s'il faudrait orienter leur activation et les faire vivre plus longtemps, ou *a contrario* s'il faudrait les faire mourir et donc provoquer leur rentrée en apoptose. Dès lors, des agents capables de moduler le déclenchement de l'apoptose, par exemple en la retardant au maximum en début d'infection et en l'accélérant en fin d'infection, pourraient jouer un rôle thérapeutique dans la résolution de la mammite bovine. La quatrième étude a montré que l'apoptose des neutrophiles isolés d'un quartier présentant une élévation persistante du taux cellulaire pouvait être provoquée *ex vivo*. L'agent utilisé n'a pas accéléré l'entrée en apoptose des neutrophiles isolés du sang. Seule l'apoptose des neutrophiles présents au site inflammatoire a été influencée, une observation en accord avec d'autres résultats indiquant que l'utilisation *in vivo* de cet agent n'affecte pas la survie de cellules « saines » et ne bloque pas la fonction des cellules immunes (Burdelya *et al.*, 2002). Il reste donc à déterminer si l'induction de l'apoptose des neutrophiles présents dans le lait d'animaux atteints de mammite avec élévation persistante du taux cellulaire pourrait présenter une application thérapeutique. Il reste également à évaluer les effets d'un tel

traitement *in vivo* sur les mécanismes de défenses de la glande mammaire, et à élucider comment serait influencée la virulence de l'agent infectieux.

Il importe également de mieux déterminer le rôle joué par les lymphocytes T. Les cellules T sont apparemment de type suppresseur lors d'infection à *Staph. aureus* et pourrait expliquer, en partie, la persistance de ce type d'infection. Réorienter la réponse vers l'expression d'un phénotype cytotoxique pourrait dès lors se montrer efficace. L'utilisation des cellules dendritiques, puissantes cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T et initiateurs de la réponse immune, pourrait s'avérer

être une approche intéressante. Il a été démontré que lors d'infection à *Staph. aureus*, la prolifération des lymphocytes de type cytotoxique était stoppée par des cellules de type suppresseur, mécanisme qui pourrait donc expliquer, du moins partiellement, la persistance des infections à *Staph. aureus* (Park *et al.*, 1993). Différentes études murines et humaines (Mahnke *et al.*, 2000 ; Steinman, 2001 ; Bonifaz *et al.*, 2002 ; 2004) laissent à penser que l'inoculation de cellules dendritiques stimulées avec des antigènes bactériens puissants provoquerait une stimulation de la réponse lymphocytaire de type cytotoxique, s'opposant dès lors à la réponse suppressive apparemment

observée dans les mammites à *Staph. aureus*. Un projet actuellement en cours dans notre laboratoire vise à transformer des monocytes sanguins bovins en cellules dendritiques pour ensuite les stimuler avec un antigène de *Staph. aureus* avant de les réinjecter à l'animal.

Finalement, il importe que les futures recherches consacrées à l'étude des mécanismes intervenant dans l'interaction hôte-pathogène répondent aussi aux attentes du consommateur. L'approche vaccinale conserve dès lors tout son intérêt grâce à son approche préventive, chère aux yeux de toute la filière laitière et particulièrement aux élevages biologiques.

REFERENCES

- BONIFAZ L., BONNYAY D., MAHNKE K., RIVERA M., NUSSENZWEIG M.C., STEINMAN R.M. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J. Exp. Med.*, 2002, **196**, 1627-1638.
- BONIFAZ L.C., BONNYAY D.P., CHARALAMBOUS A., DARGUSTE D.I., FUJII S., SOARES H., BRIMNES M.K., MOLTEDO B., MORAN T.M., STEINMAN R.M. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J. Exp. Med.*, 2004, **199**, 815-824.
- BRADLEY A.J. Bovine mastitis : an evolving disease. *Vet. J.*, 2002, **164**, 116-128.
- BURDELYA L., CATLETT-FALCONE R., LEVITZKI A., CHENG F., MORA L.B., SOTOMAYOR E., COPPOLA D., SUN J., SEBTI S., DALTON W.S., JOVE R., YU H.. Combination therapy with AG-490 and interleukin 12 achieves greater antitumor effects than either agent alone. *Mol. Cancer Ther.*, 2002, **1**, 893-899.
- BUREAU F., BONIZZI G., KIRSCHVINK N., DELHALLE S., DESMECHT D., MERVILLE M.P., BOURS V., LEKEUX P. Correlation between nuclear factor-kappaB activity in bronchial brushing samples and lung dysfunction in an animal model of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000a, **161**, 1314-1321.
- BUREAU F., DELHALLE S., BONIZZI G., FIEVEZ L., DOGNE S., KIRSCHVINK N., VANDERPLASSCHEN A., MERVILLE M.P., BOURS V., LEKEUX P. Mechanisms of persistent NF-kappa B activity in the bronchi of an animal model of asthma. *J. Immunol.*, 2000b, **165**, 5822-5830.
- BURVENICH C., PAAPE M.J., HILL A.W., GUIDRY A.J., MILLER R.H., HEYNEMAN R., KREMER W.D., BRAND A. Role of the neutrophil leucocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced E. coli mastitis in cows immediately after calving. *Vet. Q.*, 1994, **16**, 45-50.
- HARMON R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.*, 1994, **77**, 2103-2112.
- MAHNKE K., GUO M., LEE S., SEPULVEDA H., SWAIN S.L., NUSSENZWEIG M., STEINMAN R.M. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J. Cell. Biol.*, 2000, **151**, 673-684.
- PAHL H.L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 1999, **18**, 6853-6866.
- PARK Y.H., FOX L.K., HAMILTON M.J., DAVIS W.C. Suppression of proliferative response of BoCD4+ T lymphocytes by activated BoCD8+ T lymphocytes in the mammary gland of cows with Staphylococcus aureus mastitis. *Vet. Immunol.*

- Immunopathol.*, 1993, **36**, 137-151.
- RIOLLET C., RAINARD P., POUTREL B. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J. Dairy Sci.*, 2001, **84**, 1077-1084.
- SEARS P.M., SMITH B.S., ENGLISH P.B., HERER P.S., GONZALEZ R.N. Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, 1990, **73**, 2785-2789.
- SHARMA S.A., TUMMURU M.K., BLASER M.J., KERR L.D. Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells. *J. Immunol.*, 1998, **160**, 2401-2407.
- STEINMAN R.M. Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. *Mt Sinai J. Med.*, 2001, **68**, 160-166.
- ZHANG G., GHOSH S. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.*, 2000, **6**, 453-457.

**PUBLICATIONS ISSUES
DU TRAVAIL DE THÈSE**

- BOUTET P., BUREAU F., DEGAND G., LEKEUX P. Imbalance between lipoxin A4 and leukotriene B4 in chronic mastitis-affected cows. *J. Dairy Sci.*, 2003, **86**, 3430-3439.
- BOUTET P., BOULANGER D., GILLET L., VANDERPLASSCHEN A., CLOSSET R., BUREAU F., LEKEUX P. Delayed neutrophil apoptosis in bovine subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, 2004, **87**, 4104-4114.

Remerciements

Les études présentées dans le cadre de cette thèse ont pu être réalisées grâce à l'intervention du « Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture » (FRIA) et de Janssen Animal Health.