



HAL
open science

Les marqueurs du stress chez les bovins issus de clonage somatique

Anne-Claire Brisville

► **To cite this version:**

Anne-Claire Brisville. Les marqueurs du stress chez les bovins issus de clonage somatique. Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 2006. Français. NNT : . tel-02817296

HAL Id: tel-02817296

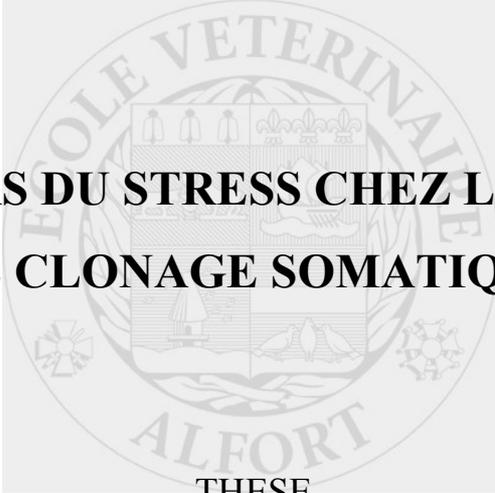
<https://hal.inrae.fr/tel-02817296>

Submitted on 6 Jun 2020

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.

Année 2006



**LES MARQUEURS DU STRESS CHEZ LES BOVINS ISSUS
DE CLONAGE SOMATIQUE**

THESE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

Le

par

Anne-Claire, Marie BRISVILLE

Née le 9 juin 1981 à Speyer (Allemagne)

JURY

Président : M.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : Dr Dominique REMY
Maître de conférences à l'ENVA

Assesseur : Dr Yves MILLEMANN
Maître de conférences à l'ENVA

Invitée

Dr Pascale CHAVATTE-PALMER
Chargée de Recherche à l'INRA

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur COTARD Jean-Pierre

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs PARODI André-Laurent, PILET Charles

Professeurs honoraires: MM. BORDET Roger, BUSSIERAS Jean, LE BARS Henri, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques, THERET Marcel

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur - Adjoint : M. DEGUEURCE Christophe, Professeur

<p>-UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur* M. DEGUEURCE Christophe, Professeur Mlle ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henri, AERC</p> <p>-UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE , MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur</p> <p>-UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE M. BRUGERE Henri, Professeur * Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur M. TIRET Laurent, Maître de conférences</p> <p>-UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur * M. TISSIER Renaud, Maître de conférences M. PERROT Sébastien, Maître de conférences</p> <p>-UNITE DE BIOCHIMIE M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences* M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences</p>	<p>- UNITE D'HISTOLOGIE , ANATOMIE PATHOLOGIQUE M. CRESPEAU François, Professeur * M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE VIROLOGIE M. ELOIT Marc, Professeur * Mme ALCON Sophie, Maître de conférences</p> <p>-DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES M. MOUTHON Gilbert, Professeur</p> <p>-DISCIPLINE : BIOLOGIE MOLECULAIRE Melle ABITBOL Marie, Maître de conférences contractuel</p> <p>-DISCIPLINE : ETHOLOGIE M. DEPUTTE Bertrand, Professeur</p> <p>-DISCIPLINE : ANGLAIS Mme CONAN Muriel, Ingénieur Professeur agrégé certifié</p>
---	--

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. FAYOLLE Pascal, Professeur - Adjoint : M. POUCHELON Jean-Louis , Professeur

<p>-UNITE DE MEDECINE M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. MORAILLON Robert, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Melle MAUREY Christelle, Maître de conférences contractuel</p> <p>-UNITE D'OPHTALMOLOGIE M. CLERC Bernard, Professeur Melle CHAHORY Sabine, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE M. DENOIX Jean-Marie, Professeur * M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences Mme CARSTANJEN Bianca, Maître de conférences contractuel Mme GIRAUDET Aude, Professeur contractuel</p> <p>-UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE M. MIALOT Jean-Paul, Professeur * (rattaché au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) Melle CONSTANT Fabienne, AERC (rattachée au DPASP)</p>	<p>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Mlle RAVARY Béangère, AERC (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel M. HIDALGO Antoine, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE RADIOLOGIE Mme BEGON Dominique, Professeur*</p> <p>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. CHERMETTE René, Professeur * M. POLACK Bruno, Maître de conférences M. GUILLOT Jacques, Professeur Melle MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences contractuel</p> <p>M. PARAGON Bernard, Professeur (rattaché au DEPEC) M. GRANDJEAN Dominique, Professeur (rattaché au DEPEC) Melle BLANCHARD Géraldine, Professeur contractuel</p>
---	---

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. CERF Olivier, Professeur - Adjoint : M. BOSSE Philippe, Professeur

<p>-UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES M. BENET Jean-Jacques, Professeur* M. TOMA Bernard, Professeur Mme HADDAD H0ANG XUAN Nadia, Maître de confèr.contractuel Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences M. SANAA Moez, Maître de conférences</p> <p>-UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur M. CERF Olivier, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences</p>	<p>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE M. COURREAU Jean-François, Professeur* M. BOSSE Philippe, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences* Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences contractuel M. ADJOU Karim, Maître de conférences</p>
---	---

Mme CALAGUE, Professeur d'Education Physique

* Responsable de l'Unité

AERC : Assistant d'Enseignement et de Recherche Contractuel

Remerciements

A M. le Professeur de la Faculté de médecine de Créteil, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Hommage respectueux.

A M. le Docteur Dominique REMY, Maître de Conférences à l'ENVA, qui m'a fait l'honneur de diriger cette thèse. Merci pour votre gentillesse tout au long de ce travail.

A M. le Docteur Yves MILLEMANN, Maître de Conférences à l'ENVA, qui a bien voulu prendre part à ce travail en tant qu'assesseur. Sincères remerciements.

A Mme le Docteur Pascale CHAVATTE-PALMER, Chargée de Recherche à l'INRA, qui a encadré ce travail avec patience et gentillesse. Merci pour votre appui, vos conseils et votre disponibilité ; notre collaboration a vraiment été enrichissante.

A M. le Professeur Jean-Paul MIALOT, ancien Professeur à l'ENVA, qui m'a proposé d'entrer dans le programme des clones. Remerciements respectueux.

A M. le Docteur Pierre MORMEDE, Directeur de Recherche à l'INRA, qui m'a accueillie au sein de son laboratoire à l'INSERM à Bordeaux lors de ce travail. Remerciements respectueux.

A M. le Docteur Andrew PONTER, maître de conférence à l'ENVA, qui m'a accueillie dans son service à l'ENVA pour réaliser les dosages plasmatiques. Remerciements respectueux.

A M. Christophe RICHARD et à toute l'équipe de Bressonvilliers, qui se sont occupés de tous ces petits clones et qui ont toujours été disponibles lors de ce travail. Merci pour votre accueil.

A Mme Christine FICHEUX qui m'a encadrée, lors de mes dosages à l'ENVA. Merci pour votre patience.

Remerciements personnels

A Mum et Papa, pour votre soutien et tout le reste. Ca y est, je suis vétérinaire... et c'est en partie grâce à vous.

A Marianne et à Oli, la tribu va être bien éparpillée l'année prochaine mais je penserai à vous... En attendant de passer Noël chez chacun de nous. Votre grande sœur est fière de vous.

A toi mon cœur, à un peu plus de 18 mois passés ensemble, au séjour au Québec et à plus j'espère. Il ne doit pas être tous les jours facile de vivre avec un petit boulet, mais je suis ton petit boulet non ?...

A tous ceux qui m'ont fait découvrir mon métier ; merci à vous pour m'avoir introduite dans le petit monde vétérinaire dans lequel j'ai trouvé un petite place qui me plaît bien du côté des bovins...

Les marqueurs du stress chez les bovins issus de clonage somatique

NOM et Prénom : BRISVILLE Anne-Claire

Résumé

Le terme stress regroupe l'ensemble des modifications biologiques d'un organisme soumis à un stimulus capable de perturber son homéostasie. La réaction de stress met en œuvre des modifications comportementales, biologiques et biochimiques. Elle active principalement le système nerveux orthosympathique, de façon immédiate et fugace, et l'axe corticotrope, de façon un peu différée mais plus pérenne. L'excès de stress est considéré comme un facteur zootechnique limitant et comme un facteur favorisant l'apparition de maladies. Pour l'évaluer on utilise des marqueurs, comportementaux, biologiques et biochimiques, ces derniers étant les plus fiables.

Les techniques de clonage sont associées avec des anomalies de développement *in utero* et lors de la période néonatale, regroupées sous le « syndrome du gros veau ». Notre travail s'inscrit dans une étude plus large qui vise à déterminer la qualité des clones bovins adultes apparemment sains.

L'objectif de notre travail est d'évaluer les paramètres liés au stress chez les clones bovins. Nous avons mesuré la température rectale, les catécholamines et cortisol urinaires ainsi que les cortisol, T3 libre et T4 libre dans le plasma des veaux clonés et de veaux témoins issus d'insémination artificielle, entre la naissance et l'âge de 18 mois. Les résultats n'ont pas montré de différence significative entre veaux clonés et veaux témoins sauf pour le cortisol plasmatique qui est plus bas à la naissance chez les veaux clonés, nés par césarienne. Cependant on observe entre la naissance et 70 jours d'âge, une large variabilité individuelle, paradoxalement plus importante chez les veaux issus de clonage somatique que chez les veaux témoins issus d'insémination artificielle. Au delà de 2 mois on n'observe plus de différence significative.

Mots clés : CLONE, BOVIN, STRESS, CATÉCHOLAMINES URINAIRES, CORTISOL URINAIRE, CORTISOLEMIE, TRIIODOTHYRONINE, THYROXINE

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr. Dominique REMY

Assesseur : Dr. Yves MILLEMANN

Invitée : Dr. Pascale CHAVATTE-PALMER

Adresse de l'auteur :

Melle Anne-Claire BRISVILLE

2, rue du capitaine Faure 25 000 BESANCON

Indicators of stress in somatic cell cloned cattle

SURNAME and Given name: BRISVILLE Anne-Claire

Summary

The word stress refers to the biological reactions of an organism when facing an aggressive stimulus called stressor. It includes behavioural, biological and biochemical changes. First, rapid and transitory reaction is triggered through the autonomic nervous system. Secondly, the hypothalamo-pituitary-adrenal axis is triggered with a slow but more durable response. Excessive stress is considered as a negative zootechnical factor and induces an increased susceptibility to pathological processes.

The process of cloning is associated with abnormal *in utero* and neonatal development, generally known as Large Offspring Syndrome (LOS). The work presented here is included in a larger programme aimed at assessing the quality of adult, apparently healthy, bovine clones.

The aim of this project was to evaluate stress factors in cloned cattle, using biochemical and physical indicators. We measured rectal temperature, urinary catecholamine and cortisol, and plasma cortisol, free-triiodothyronine and free thyroxine in cloned cattle and cattle born from artificial insemination, between birth and 18 months of age. There was no significant difference between groups at any stage but for cortisol which was lower at birth in clones (born by caesarean section). However we observed, between birth and 70 days old, large individual variations, paradoxically more important in cloned calves than in calves born from artificial insemination. After 2 months of age, no significant differences were observed.

Keywords: CLONE, STRESS, CATTLE, URINARY CATECHOLAMINES, URINARY CORTISOL, TRIIODOTHYRONINE, THYROXINE, CORTISOLEMY

Jury:

President: Pr.

Director: Dr. Dominique REMY

Assessor: Dr. Yves MILLEMANN

Guest: Dr. Pascale CHAVATTE-PALMER

Author's address:

Miss Anne-Claire BRISVILLE

2, rue du capitaine Faure

25 000 BESANCON

Table des matières

I. L'animal et le stress.....	12
A- Définitions et implications du concept de stress.....	12
1. Un concept anthropomorphique.....	12
2. Une définition biologique.....	12
3. Le stress : une réaction physiologique.....	13
4. Le stress : un outil d'évaluation du bien-être animal.....	14
a- Notion de bien-être chez l'animal.....	14
b- Le bien-être : une absence de stress.....	14
B- Physiologie du stress.....	15
1. Les stressseurs : des stimuli susceptibles de modifier l'homéostasie d'un organisme.....	15
2. Le stress : la réponse adaptative de l'organisme aux « agressions ».....	16
a- Mise en évidence de la réaction de stress.....	16
b- Les manifestations du stress.....	17
c- La cascade d'activation du stress.....	19
C- Le système sympathique et sa mise en jeu lors de stress.....	23
1. Organisation du système sympathique.....	23
2. Biosynthèse et dégradation des catécholamines.....	25
3. Les actions des catécholamines.....	27
a- Les récepteurs adrénergiques.....	27
b- Les actions métaboliques.....	28
c- Les actions sur les systèmes cardiovasculaire et respiratoire.....	28
d- Les actions sur la thermorégulation.....	29
4. La mise en jeu du système nerveux sympathique lors d'un stress.....	30
a- Mise en jeu lors d'un stress aigu.....	30
b- Mise en jeu lors d'un stress chronique.....	31
D- L'axe corticotrope et sa mise en jeu lors de stress.....	32
1. Organisation de l'axe corticotrope et régulation.....	32
a- Organisation de l'axe corticotrope.....	32
b- Régulation de l'axe corticotrope.....	35
2. Synthèse, libération et dégradation des glucocorticoïdes.....	35
3. Actions des glucocorticoïdes.....	37
a- Mécanismes d'action à l'échelle cellulaire.....	37
b- Actions biologiques des hormones glucocorticoïdes.....	37
4. Mise en jeu de l'axe corticotrope lors de stress.....	38
a- Mise en jeu lors d'un stress aigu.....	38
b- Mise en jeu lors d'un stress chronique.....	39

Conclusion de la première partie de la revue bibliographique..... 40

II. Les marqueurs de stress..... 41

A. Les marqueurs comportementaux du stress..... 41

- 1. Les marqueurs comportementaux d'un stress aigu..... 42
- 2. Les marqueurs comportementaux d'un stress chronique..... 44

B- Les marqueurs biologiques du stress..... 45

- 1. Les marqueurs biologiques d'un stress aigu..... 45
 - a- Le système cardiovasculaire..... 45
 - b- L'appareil respiratoire..... 45
 - c- La température corporelle..... 46
- 2. Les marqueurs biologiques d'un stress chronique..... 47
 - a- Le système cardiovasculaire..... 47
 - b- La croissance 47
 - c- La reproduction..... 48
 - d- La santé et la longévité..... 49

C- Les marqueurs biochimiques..... 50

- 1. Les marqueurs biochimiques d'un stress aigu..... 50
 - a- Les marqueurs dus à l'activation du système nerveux sympathique..... 50
 - b- Les marqueurs dus à l'activation de l'axe corticotrope 51
 - c- Autres paramètres utilisés comme marqueur de stress aigu..... 53
- 2. Les marqueurs biochimiques d'un stress chronique..... 54
 - a- Les marqueurs dus à l'activation du système nerveux sympathique..... 54
 - b- Les marqueurs dus à l'activation de l'axe corticotrope 55
 - c- Les marqueurs issus de l'axe thyroïdien 56

Conclusion de la seconde partie de la revue bibliographique..... 57

Introduction – Situation du sujet..... 60

I. Animaux, Matériels et Méthodes..... 62

A- Animaux 62

- 1. Méthodes d'obtention des individus clonés..... 62
 - a- Obtention des ovocytes..... 63
 - b- Obtention des embryons 63
 - c- Préparation des receveuses..... 64
 - d- Suivi des gestations..... 65
 - e- Naissance..... 65
 - f- Obtention des individus témoins..... 65
- 2- Examens des animaux..... 66

a- Examens lors de la période néonatale	66
b- Examens lors de la période de croissance.....	67
B- Mesures effectuées sur les urines.....	67
1. Dosage préalable de la créatinine.....	68
a- Problématique du prélèvement ponctuel d'urine.....	68
b- Utilisation de la créatininurie	68
c- Méthode de dosage de la créatinine.....	69
2. Le dosage des concentrations urinaires des catécholamines par HPLC.....	69
a- Choix de la technique de dosage.....	69
b- Caractéristiques du dosage.....	69
c- Protocole du dosage.....	70
3. Le dosage des glucocorticoïdes urinaires par HPLC.....	72
a- Choix de la technique de dosage.....	72
b- Caractéristiques du dosage.....	72
c- Protocole du dosage.....	72
C- Mesures effectuées sur le sérum.....	75
1. Dosage du cortisol plasmatique chez les animaux entre 1 et 70 jours.....	75
a- Choix de la technique de dosage.....	75
b- Caractéristiques du dosage.....	76
2. Dosage du cortisol plasmatique chez les animaux entre 4 et 18 mois.....	76
Choix de la technique de dosage.....	76
3. Dosage de la triiodothyronine (T3) plasmatique libre.....	77
a- Choix de la technique de dosage.....	77
b- Caractéristiques du dosage.....	77
4. Dosage de la thyroxine (T4) plasmatique libre.....	78
a- Choix de la technique de dosage.....	78
b- Caractéristiques du dosage.....	78
D- Outils statistiques.....	79
1. Utilisations des données brutes.....	79
2. Utilisations statistiques des données	79
II. Résultats.....	79
A- Températures rectales.....	79
1. Veaux de 1 à 70 jours.....	79
2. Veaux de 120 à 540 jours.....	80
B- Dosages urinaires.....	82
1. Catécholamines.....	82
a- Veaux entre 1 et 70 jours.....	82
b- Veaux entre 4 et 18 mois.....	84
2. Glucocorticoïdes.....	87

C- Dosages plasmatiques.....	88
1. Cortisol.....	88
a- Veaux de 1 à 70 jours.....	88
b- Veaux de 4 à 18 mois.....	90
2. Triiodothyronine (T3).....	91
3. Thyroxine (T4)	93
III.Discussion.....	94
A. A propos des animaux.....	95
1. Choix des témoins.....	95
2. Choix des clones.....	95
B- A propos des méthodes de mesures.....	96
1. Mesures urinaires.....	96
a- Mesures des catécholamines.....	96
b- Mesures des glucocorticoïdes.....	96
2. Mesures plasmatiques.....	97
C- A propos des résultats obtenus.....	97
1. Températures rectales.....	97
2. Catécholamines urinaires.....	97
3. Cortisol plasmatique.....	98
4. T3 et T4 plasmatiques libres.....	99
D- Les bovins clonés sont-ils des bovins normaux ?.....	99
1. Observations des veaux clonés avant le vêlage.....	99
2. Observations sur les veaux morts à la naissance ou après.....	100
3. Statut des veaux clonés par rapport aux veaux témoins.....	100

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Deux schémas conceptuels du stress.

Figure 2 : Quelques facteurs modulant la perception du système nerveux central face à un stressueur potentiel, ainsi que sa réaction.

Figure 3 : Schéma du stress chez un organisme et ses conséquences.

Figure 4 : Organisation du système nerveux sympathique / autonome.

Figure 5 : Principales étapes de la biosynthèse des catécholamines.

Figure 6 : Principales voies de dégradation des catécholamines.

Figure 7 : Organisation schématique de l'axe corticotrope.

Figure 8 : Chaîne de synthèse des corticostéroïdes.

Figure 9 : Principe du test de freination à la dexaméthasone et échappement au test lors de stress chronique.

Figure 10 : Exemple de chromatogrammes par HPLC lors du dosage des catécholamines.

Figure 11 : Exemple de chromatogrammes par HPLC lors du dosage des glucocorticoïdes.

Figure 12 : Courbes des températures des veaux, clonés et témoins, entre 1 et 70 jours

Figure 13 : Courbes des températures des veaux, clonés et témoins, entre 4 et 18 mois

Figure 14 : Courbes de la noradrénaline dans les urines des veaux clonés et témoins entre 1 et 70 j.

Figure 15 : Courbes de l'adrénaline dans les urines des veaux clonés et témoins entre 1 et 70 j.

Figure 16 : Courbes de la noradrénaline dans les urines des veaux clonés et témoins entre 4 et 18 mois.

Figure 17 : Courbes de l'adrénaline dans les urines des veaux clonés et témoins entre 4 et 18 mois.

Figure 18 : Courbes du cortisol plasmatique chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours

Figure 19 : Courbes du cortisol plasmatique chez les veaux clonés et témoins entre 4 et 18 mois

Figure 20 : Courbes de T3 plasmatique chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours

Figure 21 : Courbes de T4 plasmatique chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours

Tableaux

Tableau 1 : Les récepteurs adrénergiques, leur couplage et leurs actions à l'échelle cellulaire.

Tableau 2 : Echantillons prélevés et analysés.

Tableau 3 : Valeurs urinaires moyennes d'adrénaline (A) et de noradrénaline (NA) chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours.

Tableau 4 : SEM des mesures urinaires d'adrénaline (A) et de noradrénaline (NA) chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours.

Tableau 5 : Valeurs urinaires moyennes d'adrénaline (A) et de noradrénaline (NA) chez les veaux clonés et témoins entre 4 et 18 mois.

Tableau 6 : SEM des mesures urinaires d'adrénaline (A) et de noradrénaline (NA) chez les veaux clonés et témoins entre 4 et 18 mois.

Tableau 7 : Valeurs moyennes de la cortisolémie chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours.

Tableau 8 : SEM des valeurs de la cortisolémie chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours.

Tableau 9 : Valeurs moyennes de la cortisolémie chez les veaux clonés et témoins entre 4 et 18 mois.

Tableau 10 : SEM des valeurs de la cortisolémie chez les veaux clonés et témoins entre 4 et 18 mois.

Tableau 11 : Valeurs moyennes de T3 plasmatique chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours.

Tableau 12 : SEM des valeurs du T3 plasmatique chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours.

Tableau 13 : Valeurs moyennes du T4 plasmatique chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours.

Tableau 14 : SEM des valeurs du T4 plasmatique chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours.

Table des annexes

Annexe 1 : Protocole Fisher de dosage de la créatinine

Annexe 2 : Fiche technique du kit de dosage de la créatinine

Annexe 3 : Protocole de dosage des catécholamines urinaires par HPLC

Annexe 4 : Protocole de dosage des glucocorticoïdes urinaires

Annexe 5 : Chromatogrammes des glucocorticoïdes dans des urines bovines : mise en évidence du bruit de fond

Introduction

Depuis la naissance de la brebis Dolly, les équipes scientifiques ont réussi à cloner un certain nombre d'espèces animales à partir de cellules somatiques variées. Chaque nouvelle espèce est un nouveau pari gagné qui laisse entrevoir de larges perspectives quant au devenir et à l'utilisation de ces clones. A l'heure actuelle près de 80 bovins clonés sont nés, vivent, produisent et se reproduisent au sein de la station expérimentale de l'INRA de Bressonvilliers (Essonne, 91). Les premières observations faites sur ces animaux ont montré un certain nombre d'anomalies de développement *in utero* puis en période néonatale. Un moratoire de l'INRA interdit pour l'instant l'entrée de bovins clonés ou de leurs produits dans la chaîne alimentaire. Afin de lever ce moratoire, une large étude a été entreprise pour déterminer si les animaux clonés sont des animaux normaux. Au sein de cette étude, un volet s'intéresse à l'état clinique des clones. Notre travail s'intègre dans ce volet et a pour objet de déterminer si les bovins issus de clonage somatique sont plus sensibles au stress produit par des conditions d'élevage classiques en France. Mon rôle dans ce travail a été de pratiquer les examens cliniques des bovins âgés de plus de 4 mois et de réaliser les dosages urinaires à l'INSERM de Bordeaux et plasmatiques à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

Après avoir montré que le stress est un phénomène physiologique normal de l'organisme et comment il se manifeste, nous déterminerons par quels moyens nous pouvons le mettre en évidence et l'évaluer chez des animaux et en particulier chez des bovins. Nous tacherons ensuite de choisir des marqueurs du stress adaptés aux bovins, aux conditions expérimentales qu'impose l'élevage de génisses, et aux caractéristiques du stress subi.

Puis nous décrirons les expériences menées afin d'évaluer la réaction de stress chez des veaux issus de clonage somatique et chez des veaux témoins issus d'insémination artificielle. Après avoir décrit les animaux et les méthodes employées, nous montrerons les résultats que nous avons obtenus principalement au moyen de tableaux et graphiques, puis nous discuterons ces résultats en les intégrant dans la problématique de l'étude dans son ensemble.

Première partie : données bibliographiques

I. L'animal et le stress

A- Définitions et implications du concept de stress

1. Un concept anthropomorphique

Dans notre société occidentale, tout est « stressant » : le travail, les voyages, la vie de famille... tout semble être une épreuve que l'individu doit subir et surmonter. Le stress est souvent accusé d'être la cause de tous nos maux et la pensée collective le considère comme une maladie. Mais finalement qu'est ce que le stress ? On pourrait le décrire comme le mal-être ressenti par l'individu dans une situation qui lui est inconfortable physiquement ou psychologiquement. Un problème se pose lorsqu'il s'agit de le caractériser puisque l'essence même d'une sensation est d'être propre à chacun. En effet le stress est aisément décrit par un homme qui dit « ne pas se sentir bien parce qu'il subit trop de pressions » mais s'agit-il d'une réalité biologique ? Et si c'est le cas les animaux peuvent-ils eux aussi ressentir du stress ?

2. Une définition biologique

Le terme de *stress* est apparu pour la première fois dans un dictionnaire anglais du XV^{ème} siècle – *The shorter Oxford English Dictionary* - sous la double définition d'une « pression physique exercée sur un objet » et de « l'effet de cette pression sur l'objet ». Le terme de stress était à l'origine utilisé par les médecins pour qualifier la force exercée sur un objet. Puis d'autres domaines se sont appropriés ce mot (d'après Broom et Johnson, 1993) comme la physiologie (Cannon, 1935), la psychologie (Lee, 1966) ou la biologie animale (Moberg, 1987). Darwin constate dès 1872 dans « *The Expression of the Emotions in Man and Animals* » (d'après Fraser et al., 1975) que des expériences très variées provoquent, chez un même organisme, des réactions identiques telles que des tremblements en cas de peur, d'angoisse ou de froid.

Le premier à mettre une définition biologique derrière le terme de stress est Hans Selye qui, en 1973, définit le stress comme « la réaction non-spécifique d'un organisme soumis à un environnement agressif » (d'après Dantzer et Mormède, 1983). Il dissocie le stress de son ou ses agents causaux qu'il nomme « stressors » (stresseurs dans une traduction littérale).

3. Le stress : une réaction physiologique

Selye (d'après Moberg, 1985 et Mormède, 1995) définit donc le stress comme une réaction normale de l'organisme lorsqu'il est soumis à des agents potentiellement nuisibles appelés stresseurs. Il s'agit, comme le souligne Mormède (1995), d'une situation tout à fait physiologique par laquelle l'organisme se protège afin de maintenir son intégrité. Cependant, comme nous le verrons par la suite, l'ensemble de ces réactions peut devenir préjudiciable pour l'organisme lui-même. Il s'agit d'une situation que l'on connaît par ailleurs en immunologie lorsque les conséquences de la mise en œuvre de la réponse immunitaire portent plus atteinte à l'homéostasie de l'organisme que l'agent microbien contre lequel elle est activée. On peut citer par exemple les réactions d'hypersensibilité de type 3 dans lesquelles ce sont les immun-complexes formés par l'adhésion d'anticorps sur des antigènes circulants qui, en allant se déposer au niveau des glomérules rénaux, provoquent une insuffisance rénale potentiellement mortelle pour l'organisme. De la même façon, lorsque une réaction de stress se manifeste de façon intense vis-à-vis d'un stresseur, les conséquences de l'activation de ses différents systèmes acteurs sont beaucoup plus néfastes que le stresseur ne peut l'être. En guise d'exemple on peut signaler l'accélération du rythme cardiaque due à un stresseur sonore qui peut se maintenir parfois jusqu'à devenir une tachycardie ventriculaire au cours de laquelle le cœur bat tellement vite qu'il n'a pas le temps de se remplir et de jouer son rôle de pompe. Dans ce cas, la circulation sanguine ne se fait plus correctement et les organes vitaux risquent l'anoxie. Ce n'est pas le stresseur qui met en péril la survie de l'organisme mais la réaction de stress qu'il provoque.

4. Le stress : un outil d'évaluation du bien-être animal

a- Notion de bien-être chez l'animal

L'animal prend une place chaque jour croissante dans notre société. Initialement un outil de travail et/ou un produit de consommation, il est également devenu un objet affectif en entrant dans nos foyers. Aussi avons-nous été amenés à le considérer comme un « individu » sensible, sujet aux sensations comme la douleur, ou aux émotions comme la peur. Les interactions humain-animal ont évolué et sont devenues plus affectives : le cheval, par exemple, qui était un « partenaire » de travail lorsqu'il tractait un véhicule et servait de monture, est devenu un partenaire sportif et est aujourd'hui associé au loisir, et donc au plaisir, dans l'imaginaire populaire (Broom et Jonhson 1993). On s'émeut de sa santé comme de celle d'un membre de la famille, et on s'inquiète de son confort, de son bien-être. Progressivement cet empressement vis-à-vis des animaux « familiers et sociaux » comme le chien ou le cheval, s'est appliqué à l'ensemble du monde animal et notamment aux animaux de ferme, appelés également animaux de rente, dont la vie est principalement économique. Les considérations relatives au bien-être animal sont telles que les autorités ont légiféré à leur propos. Aussi a-t-on eu besoin de définir la notion de *bien-être*. On peut la rapprocher de la notion de *santé* définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme est « un état de complet bien-être physique, mental et social, et ne consiste pas seulement en une absence de maladie ou d'infirmité » (OMS, 1946).

b- Le bien-être : une absence de stress

A l'heure actuelle on évalue le bien-être chez l'animal par l'absence de mal-être et donc de stress (Moberg, 1985). C'est pourquoi de nombreuses études ont été menées pour étudier la physiologie et les mécanismes du stress. Puis on a cherché des moyens d'en évaluer le niveau par ses différents effets sur les animaux étudiés : dans un premier temps chez des animaux de laboratoire, comme les rats, ou de rente, comme les porcs. Aujourd'hui le stress est une notion très importante dans le monde de l'élevage puisqu'il a influencé les normes de bâtiments et les techniques d'élevage, comme le fait de donner des aliments solides fibreux aux veaux de boucherie ou de ne plus les élever exclusivement en case individuelle.

B- Physiologie du stress

Le mot stress est utilisé aussi bien dans une situation inconfortable, comme se trouver dans un lieu surchauffé, que lors d'un angoissant conflit psychologique, lorsque que l'on doit prendre une décision importante par exemple. Les hommes ont développé le concept de stress de façon intuitive et il s'agit pour nous de l'objectiver grâce à des témoins biologiques.

1. Les stressors : des stimuli susceptibles de modifier l'homéostasie d'un organisme

Le dictionnaire définit le stress comme « l'ensemble des perturbations biologiques et psychiques provoquées par une agression extérieure quelconque sur un organisme » (Larousse 1998). En ce qui concerne les animaux nous nous limiterons évidemment aux perturbations biologiques, mais par rapport à cette définition littéraire nous ajouterons les agressions internes que peut subir l'organisme (comme une hypoglycémie). Ainsi se dessine la notion d'homéostasie et de perturbateurs de cette homéostasie que Selye (1976) le premier, nomme « stressors ».

Il s'agit de divers stimuli que l'on peut classer comme suit :

- des stimuli externes à l'organisme :

les stimuli physiques comme la température (trop élevée ou trop basse), une plaie ou l'humidité,

les stimuli sociaux comme la surpopulation, le confinement ou l'isolement.

-des stimuli internes à l'organisme :

les stimuli biochimiques tels l'hypoglycémie, l'hypovolémie ou l'hypoxie,

les stimuli psychologiques tels la peur ou la douleur.

2. Le stress : la réponse adaptative de l'organisme aux « agressions »

a- Mise en évidence de la réaction de stress

Cannon (1929) a été le premier à décrire la mise en œuvre du système nerveux autonome lorsqu'un organisme est soumis à un stimulus.

« *Quand un chat est effrayé, ses pupilles se dilatent, l'estomac et l'intestin sont inhibés, le cœur bat rapidement et les poils du dos et de la queue sont dressés* » (Cannon d'après Mormède, 1995).

Il observe la mobilisation générale du système nerveux sympathique qui a pour conséquence une mise à disposition d'énergie permettant à l'organisme de réagir que ce soit par la fuite ou l'affrontement : il nomme cette réaction « flight/fight syndrome ».

Puis Selye (1976) (d'après Mormède, 1995) constate que soumis à différents stimuli, un organisme subit des modifications biologiques susceptibles de le conduire à un état pathologique. Il observe, à l'autopsie des animaux de laboratoire qu'il utilise, une triade de symptômes récurrents : hypertrophie des glandes surrénales, atrophie du thymus et des nodules lymphoïdes, ulcérations gastro-intestinales. De plus, il décrit les mêmes réactions face aux différents stimuli que sont l'infection microbienne, l'administration de toxines ou l'exposition au froid. Il en conclut que la réaction de stress est non spécifique du stresser et nomme cet ensemble de réactions « *General Adaptation Syndrome ou GAS* » (d'après Moberg, 1985 et Dantzer & Mormède, 1983) qui se traduit principalement par la sécrétion d'hormones corticostéroïdes et de catécholamines dans le flux sanguin. Ce syndrome se décompose en 3 stades (Selye d'après Moberg, 1985 et Lauffenburger, 1999) :

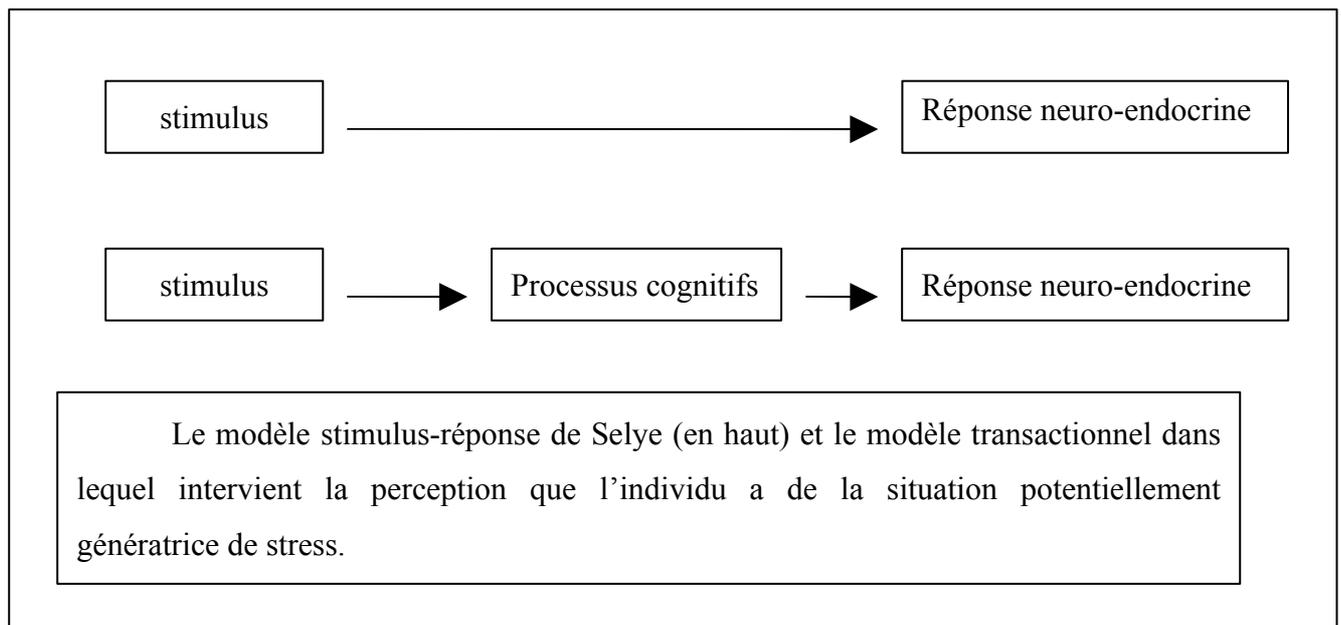
- la **réaction d'alarme ou d'urgence** qui active le système orthosympathique et durant laquelle l'organisme réagit au stimulus ressenti.

- la **réaction de résistance** qui active le système neuroendocrine et durant laquelle l'organisme est capable de répondre aux exigences physiologiques du maintien de son homéostasie.

- enfin si le stimulus se maintient et que la situation de stress persiste, survient la **phase d'épuisement** au cours de laquelle peuvent apparaître diverses maladies.

Le schéma de Selye a été remis en cause suite aux progrès de la science dans le domaine de la neuro-endocrinologie. En effet le caractère systématique, quasi réflexe, de la réaction de stress est contesté et on prolonge à l'heure actuelle son concept par un schéma dit « transactionnel » (Dantzer, 1994) qui fait intervenir un maillon supplémentaire : l'interprétation du stimulus par l'individu. En effet Mason (1971) (d'après Moberg, 1975 et Hay, 1999), a mené l'expérience suivante : il a « oublié » de distribuer leur repas à certains singes d'une animalerie expérimentale. Ces animaux se sont manifestés bruyamment et présentaient une cortisolémie plasmatique très élevée. Par contre lors d'un repas suivant il a distribué à certains singes des croquettes aromatisées sans aucune valeur énergétique et dans cette situation aucun des singes ne s'est manifesté et ni ne présentait d'hypercortisolémie. Ainsi ce n'est pas le défaut d'apport de substances nutritives qui a déclenché la réaction de stress mais l'idée d'être privé de repas. Le maillon supplémentaire du modèle transactionnel est la perception que l'individu a de la situation. (Figure 1)

Figure 1 : Deux schémas conceptuels du stress



b- Les manifestations du stress

La réaction de stress a pour but de rétablir l'homéostasie de l'organisme agressé afin de le maintenir dans les limites des normes vitales. Pour réagir à un stressueur l'organisme doit au préalable le percevoir et le considérer comme anormal. Puis il fait intervenir différents systèmes afin de remédier à ses effets. Le stress met donc en œuvre le système sensoriel, qu'il soit interne ou externe, puis le système nerveux central qui intègre les informations obtenues et orchestre une réponse biologique non spécifique au stressueur. Trois types de réponses sont possibles.

b-1. Une réponse comportementale

C'est la réponse la plus simple et la plus fréquemment mise en œuvre par l'organisme. Un animal qui a trop chaud va rechercher une zone plus fraîche : il s'agit d'une réponse adaptée au stimulus ressenti. Par contre soumis à la peur la réaction peut être différente d'un animal à l'autre à savoir fuir ou faire face. La réponse comportementale permet à l'organisme de s'éloigner du stresser sans l'éliminer et fait intervenir le cortex moteur ainsi que le système myoarthrosquelettique.

b-2. Une réponse nerveuse autonome

Elle est orchestrée par le système nerveux central et ses effecteurs sont les structures du système nerveux autonome. Il s'agit d'une réponse rapide et non spécifique mise en œuvre par le système orthosympathique. Par exemple, la peur provoque une augmentation du rythme cardiaque *via* la libération de catécholamines (noradrénaline par les fibres nerveuses et adrénaline par la médullo-surrénale). Ce type de réaction peut rapidement être démesuré par rapport au stimuli et a tendance à s'emballer mais elle est fugace : la durée de demi-vie plasmatique des catécholamines est inférieure à une minute (Mormède, 1995).

b-3. Une réponse neuroendocrine

Elle met en œuvre l'axe hypothalamo-hypophysaire et ses différents effecteurs que sont les glandes endocrines, les glandes surrénales principalement. La plaque tournante de ce système est l'hypophyse qui est régulée par l'hypothalamus *via* des neuro-hormones. Ce dernier permet de faire le lien entre l'intégration des informations ayant lieu au niveau de centres corticaux, et la réaction mise en œuvre par le système hypophysaire. Ces structures contrôlent notamment le comportement et le métabolisme de l'organisme et ceci explique certains aspects du stress. Les principaux axes endocrines modifiés par le stress sont les axes corticotrope, gonadotrope et thyroïde ainsi que les sécrétions d'hormone de croissance et de prolactine.

c- La cascade d'activation du stress

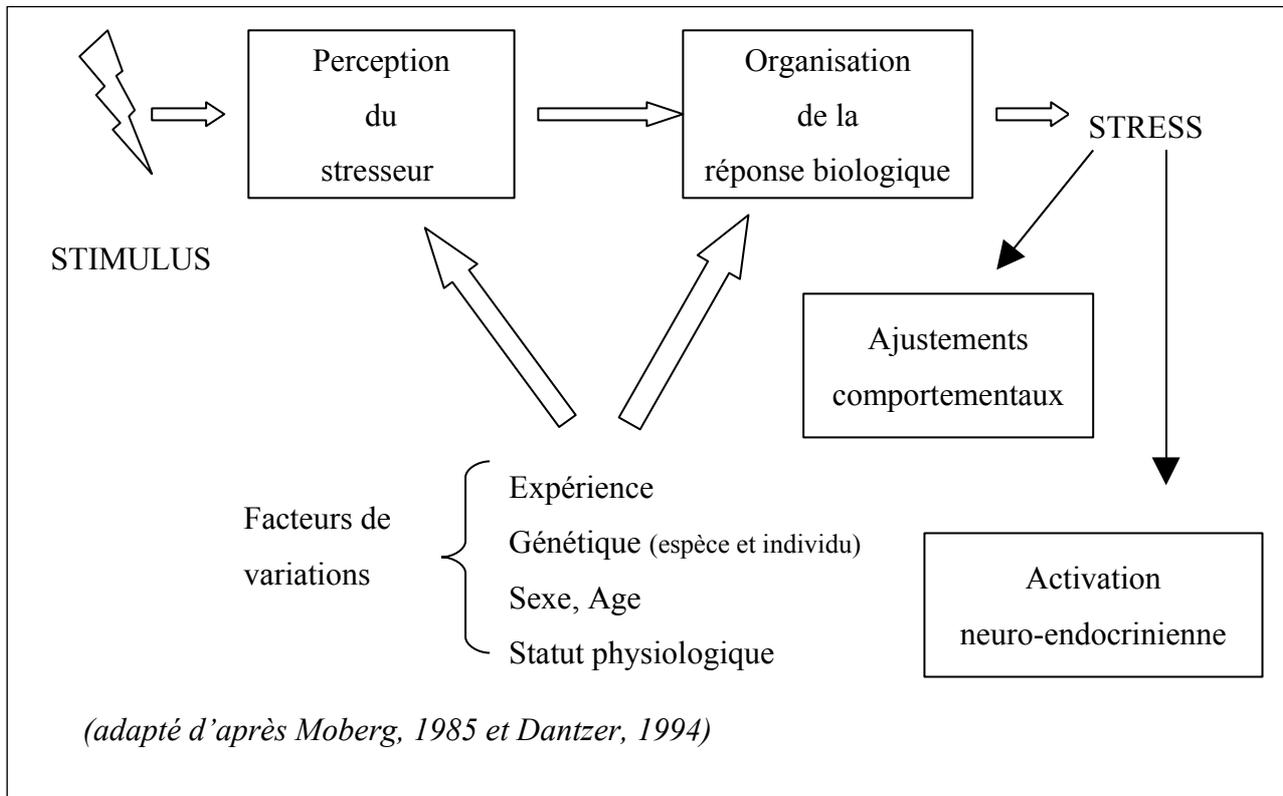
c-1. Perception et intégration du stimulus

Le stress étant une réponse adaptative de l'organisme à un stimulus, celui-ci doit dans un premier temps être perçu. Ainsi les premiers organes mis en jeu lors de stress sont les organes sensoriels. Les stimuli externes sont perçus via les récepteurs sensoriels classiques du toucher, de la douleur, de la chaleur... Interviennent aussi des récepteurs sensoriels internes garants de l'homéostasie tels les récepteurs carotidiens de la pression artérielle. Enfin les stimuli psychologiques et sociaux sont directement « ressentis » au niveau du cerveau.

Puis l'information est acheminée via les nerfs sensitifs jusqu'au cerveau où va se réaliser l'intégration. Celle-ci met en œuvre le cortex sensoriel, le système limbique et la formation réticulée qui traitent l'information afin d'en déterminer le niveau « d'agressivité » (Kagan et Levy, 1974 d'après Moberg, 1985). Puis si le stimulus est considéré comme perturbateur de l'homéostasie ou de l'intégrité de l'organisme, l'hypothalamus est activé : il est le maître d'œuvre de la réaction de stress.

On perçoit à travers ce modèle comment une même situation peut déclencher une réaction de stress chez un individu et ne rien déclencher chez un autre. On comprend également comment intervient l'expérience et comment un individu peut s'habituer à une situation fréquente jusqu'à ne plus manifester de stress lorsqu'il s'y trouve confronté. Enfin on perçoit à travers la mise en jeu du système nerveux central, les nombreux facteurs capables d'influencer la perception et l'intégration d'une information, comme l'âge, la maturité du système nerveux, ou le sexe de l'individu. On peut également expliquer une certaine prédisposition ou une sensibilité plus importante de certains individus voire de certaines familles, due à leur patrimoine génétique (Figure 2).

Figure 2 : Quelques facteurs modulant la perception du système nerveux central face à un stressueur potentiel, ainsi que sa réaction



c-2. L'hypothalamus : un chef d'orchestre

Une fois le stimulus perçu comme un stressueur, le système nerveux central va organiser la réponse biologique. Celle-ci comprend une réponse non spécifique et des réponses plus ou moins spécifiques qui, articulées entre elles, constituent la réaction d'un individu face à un événement à un moment donné. L'hypothalamus apparaît comme la pierre angulaire de la cascade d'activation du stress. En effet son noyau paraventriculaire reçoit de nombreuses afférences qui le renseignent sur l'état de l'organisme (d'après Mormède, 1995) :

- l'organe sous-fornical appréhende l'équilibre physico-chimique du sang,
- les centres bulbaires envoient, par voie neuronale, des informations relatives au fonctionnement du système cardiovasculaire,
- le noyau hypothalamique ventromédian est responsable de l'équilibre énergétique de l'organisme (contrôle négatif sur le noyau paraventriculaire),
- le système limbique est le siège des émotions.

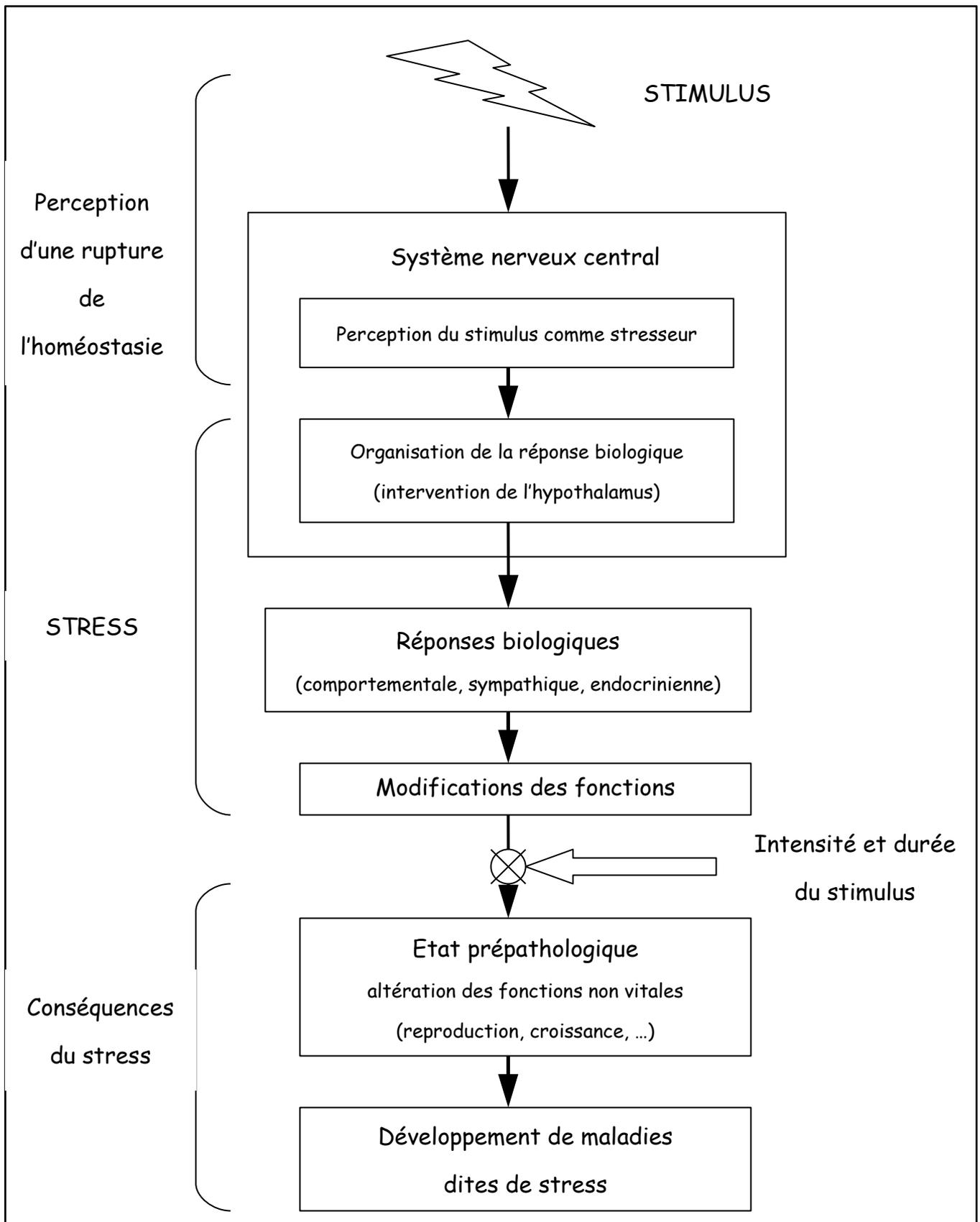
L'hypothalamus apparaît ici comme le carrefour des informations afférentes et des signaux efférents vers les différents systèmes effecteurs.

c-3. Les systèmes biologiques effecteurs

Le premier système biologique activé est le système myoarthrosquelettique qui participe à la réponse comportementale de l'organisme. Celle-ci peut souvent suffire au rétablissement de l'homéostasie par exemple s'abriter du froid en rentrant à l'étable si on considère des bovins en pâture. Si cela ne suffit pas, interviennent les systèmes neuro-endocriniens : sympathique et corticotrope principalement, qui eux sont mis en œuvre de façon non spécifique. Ainsi les réserves énergétiques de l'organisme vont être mobilisées notamment *via* une lipomobilisation. A ce stade, et lorsque le stress est d'amplitude et de durée modérée, l'homéostasie se rétablit alors que l'organisme a peu souffert. Cependant il a fourni un travail et utilisé une partie de ses réserves énergétiques pour y parvenir. On peut citer en exemple la sécrétion de corticostéroïdes qui augmente la néoglucogénèse et la mise à disposition de source d'énergie pour les muscles, mais qui dégrade également des protéines dites de structure pour y parvenir, diminuant ainsi les capacités de croissance de l'organisme.

On voit ici que le stress n'est pas dépourvu de conséquences et ce même lorsque le stress est de faible importance. On perçoit également comment un stress peut devenir pathologique lorsque l'organisme, malgré toutes les réponses biologiques qu'il peut mettre en œuvre, est dépassé (Figure 3). Dans ce cas ce sont les fonctions non vitales qui en pâtissent les premières, telles la croissance ou la reproduction (Moberg, 1985). Si le stress persiste, et que l'homéostasie n'est pas rétablie, on peut arriver à une situation mettant en péril la survie de l'organisme soit directement par pénurie de métabolites énergétiques, soit indirectement par une moindre résistance aux agents pathogènes de l'environnement. Fraser, Ritchie et Fraser (1975) en proposent une illustration à travers le cas de porcs morts subitement après un geste de routine pratiqué la veille dans l'élevage, ou celui de porcelets plus sensibles à l'entérite colibacillaire dans les 20 jours qui suivent le sevrage, une situation connue pour être particulièrement stressante pour le porcelet.

Figure 3 : Schéma du stress chez un organisme et ses conséquences (d'après Moberg, 1985)



C- Le système sympathique et sa mise en jeu lors de stress

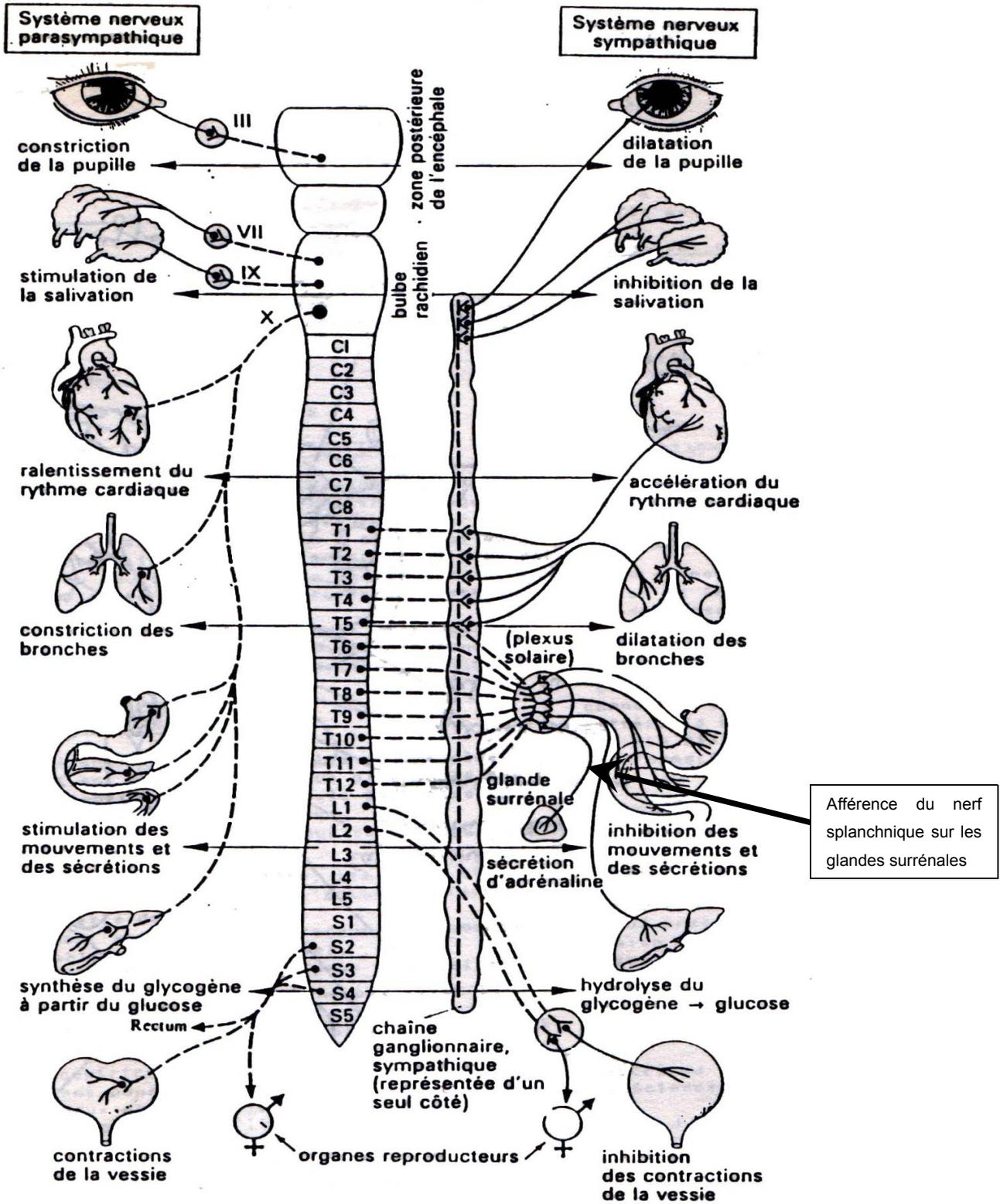
Le système nerveux autonome orthosympathique est très rapidement activé lors de stress chez un organisme et il est responsable de la plupart des symptômes observés comme la variation du rythme cardiaque et de la pression sanguine ou la piloérection. Il convient de bien connaître son fonctionnement et ses effets biologiques pour comprendre son rôle lors de stress.

1. Organisation du système sympathique

Le système nerveux autonome ou végétatif (SNV) est responsable du fonctionnement de tous les organes à l'exception du système myoarthrosquelettique. Il se décompose en deux branches : la branche orthosympathique (sympathique, Σ), plutôt décrite comme un système d'alerte, catabolique, et la branche parasympathique, plutôt décrite comme un système de repos, anabolique. Seul le rôle du Σ dans le stress a été étudié.

Le système nerveux sympathique est plus un ensemble fonctionnel qu'un véritable ensemble organique. Il est constitué d'un réseau de neurones catécholaminergiques qui libèrent de la noradrénaline localement au niveau des synapses effectrices et des cellules chromaffines de la médulla des glandes surrénales. Ces dernières, sous l'influence du nerf splanchnique, libèrent en retour des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) dans le flux sanguin. Les nerfs sympathiques sont contrôlés par des neurones pré-ganglionnaires cholinergiques dont le corps cellulaire se trouve dans la moelle épinière thoraco-lombaire (Figure 4). Ces neurones sont eux mêmes placés sous le contrôle des centres nerveux supérieurs. Le nerf splanchnique, qui appartient au Σ , est issu de la moelle thoracique postérieure. Il innerve les cellules médullo-surrénales qui sont donc considérées comme des éléments post-ganglionnaires en raison de leur spécialisation dans la synthèse de catécholamines. Ainsi le système nerveux sympathique dispose de deux modes d'action : l'un local et ciblé via les fibres nerveuses post-ganglionnaires et l'autre à distance vis-à-vis de l'ensemble des organes possédant les récepteurs adéquats *via* la circulation sanguine qui véhicule les catécholamines libérées par les glandes surrénales (d'après Mormède, 1995).

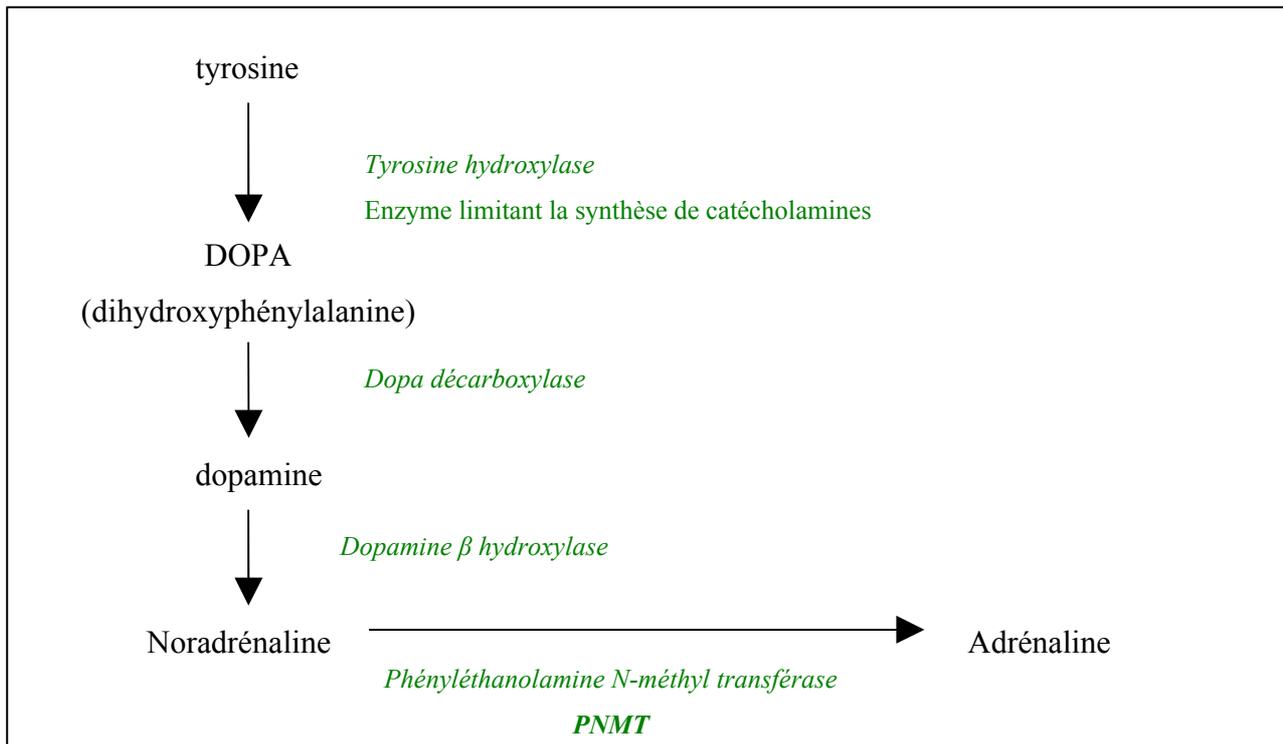
Figure 4 : Organisation du système nerveux sympathique autonome (d'après http://bio.m2osw.com/gcartable/systeme%20nerveux/systeme_autonaume.htm)



2. Biosynthèse et dégradation des catécholamines

Les catécholamines sont synthétisées par les tissus compétents à partir de la tyrosine, un acide aminé non essentiel obtenu dans l'alimentation ou par hydroxylation de la phénylalanine. Cette première étape est l'étape limitante de la synthèse des catécholamines du fait de la faible activité de l'enzyme. La figure 5 schématise les principales étapes de cette synthèse.

Figure 5 : Principales étapes de la biosynthèse des catécholamines

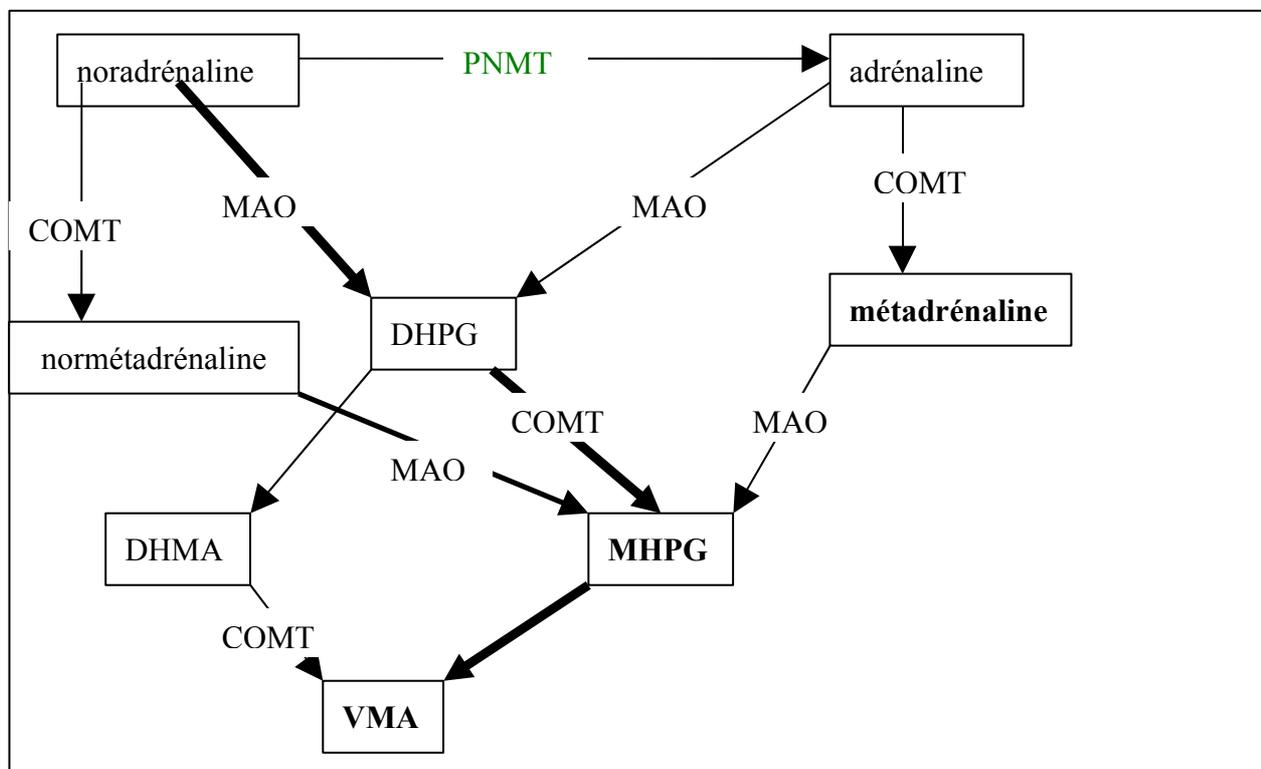


A noter que la dopamine est à la fois un intermédiaire réactionnel et le neurotransmetteur pour certaines synapses du système neurovégétatif et du système nerveux central dont le rôle est encore mal défini. La noradrénaline est le neurotransmetteur des neurones post-ganglionnaires du Σ . De fait sa libération est locale et on n'en retrouve qu'une très faible quantité dans le sang. En revanche, l'adrénaline est une hormone libérée par les glandes médullo-surrénales dans le flux sanguin. L'adrénaline et la noradrénaline sont issues des mêmes voies de synthèse. Le facteur qui induit la conversion de noradrénaline en adrénaline dans les cellules chromaffines de la médullosurrénale est la présence de l'enzyme *phényléthanolamine N-méthyl transférase* (PNMT). Celle-ci n'est synthétisée qu'en présence de fortes concentrations de glucocorticoïdes (fabriqués en grande quantité dans les glandes cortico-surrénales).

Les catécholamines ont une demi-vie extrêmement courte, de l'ordre de la minute (d'après Hay, 1999). Cette fugacité est due à un catabolisme efficace. La majeure partie de la noradrénaline est recaptée dans le neurone présynaptique par un système de pompe, pour être recyclée ou dégradée. Le catabolisme des catécholamines se fait par deux voies principales. La première est une oxydation par la *monoamine oxydase* MAO, une enzyme mitochondriale du foie, des reins, du cerveau et des terminaisons sympathiques. La seconde est une méthylation par la *catéchol-O-méthyl transférase* COMT. Cette enzyme est présente dans de nombreux organes, à l'exclusion des terminaisons sympathiques, mais la majeure partie se concentre dans les reins et le foie (Golstein, 1995 d'après Hay, 1999). Les différents métabolites intermédiaires peuvent être des substrats de l'une ou de l'autre des deux voies et lorsqu'une des voies est saturée, l'activité de la seconde est augmentée. Ainsi il est impossible de savoir de laquelle de deux voies provient un métabolite particulier. Les produits terminaux de ces dégradations (figurés en gras sur la Figure 6) sont : l'acide vanylmandélique (VMA) et le 4-hydroxy-3-méthoxy-phénylglycol (MHPG) pour la noradrénaline, et le VMA et la métadrénaline pour l'adrénaline. Les quantités relatives de métabolites sont représentées par l'épaisseur des flèches sur la Figure 6.

Figure 6 : Principales voies de dégradation des catécholamines

(d'après Hay, 1999)



Ces différents métabolites peuvent faire l'objet d'une glucurono- ou sulfo-conjugaison, puis sont éliminés par voie urinaire (Kopin, 1985 d'après Hay, 1999).

3. Les actions des catécholamines

a- Les récepteurs adrénergiques

Les actions des catécholamines sont principalement orientées vers le catabolisme et la mise à disposition d'énergie pour l'organisme. En ce sens le système sympathique, qui met en jeu les catécholamines, est considéré comme un système d'alerte. Les catécholamines exercent leurs actions au niveau des tissus innervés par le Σ et des tissus porteurs de récepteurs (de type hormonaux) à l'adrénaline. Les récepteurs catécholaminergiques se divisent en récepteurs α_1 , α_2 et β et leur activation provoque, via des protéines G, la production de seconds messagers et l'activation de canaux ioniques à l'intérieur des cellules cibles. Le Tableau 1 présente les différents types de récepteurs et les effets de leur activation.

Tableau 1 : Les récepteurs adrénergiques, leur couplage et leurs actions à l'échelle cellulaire (d'après Hay, 1999)

récepteurs α_1 -adrénergiques	récepteurs α_2 -adrénergiques	récepteurs β -adrénergiques
Sont couplés à des protéines Gq. Modulation de l'activité des phospholipases à l'intérieur de la cellule.	Sont couplés à la protéine Gi. Inhibition de l'adénylcyclase, activation des canaux potassiques, inhibition des canaux calciques.	Sont couplés à la protéine Gs. Stimulation de l'adénylcyclase.

On notera également que toutes les catécholamines n'ont pas la même affinité pour tous les récepteurs. L'adrénaline et la noradrénaline activent de la même façon les récepteurs α et β_1 mais on constate une différence dans l'activation des récepteurs β_2 et β_3 . La noradrénaline a peu d'effets sur les récepteurs β_2 au contraire de l'adrénaline. Par contre les récepteurs β_3 sont 10 fois plus sensibles à la noradrénaline qu'à l'adrénaline.

Enfin les récepteurs sont répartis de façon très hétérogène dans les différentes cellules de l'organisme. Ainsi l'activation de deux sous-types différents n'aura pas les mêmes conséquences biologiques.

b- Les actions métaboliques

Les catécholamines stimulent la mise à disposition de glucose pour l'organisme via divers mécanismes directs ou indirects. Elles stimulent la glycogénolyse afin de produire du glucose à partir du glycogène dans le foie via les récepteurs $\alpha 1$ et $\beta 2$ adrénergiques, et dans les muscles via les récepteurs $\beta 2$ adrénergiques. Elles inhibent également la sécrétion d'insuline par le pancréas via des mécanismes $\alpha 2$ adrénergiques et réduisent l'utilisation de glucose par les tissus insulino-dépendants. D'autre part elles activent indirectement la production de glucose par le foie. Ainsi les catécholamines participent à plusieurs niveaux à la mise en place d'une hyperglycémie. Les catécholamines provoquent également une lipolyse au niveau du tissu adipeux, via des récepteurs $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\beta 3$, et participent à la libération d'acides gras volatils et de glycérol dans la circulation générale (Hay, 1999).

Ainsi les catécholamines participent à l'accroissement de la quantité de métabolites énergétiques circulants et donc disponibles pour les cellules.

c- Les actions sur les systèmes cardiovasculaire et respiratoire

Les catécholamines ont des effets cardiaques variés. Elles augmentent le débit, la fréquence et la force de contraction du cœur *via* des effets $\beta 1$. Elles augmentent également la pression sanguine par vasoconstriction des vaisseaux périphériques, via une action sur les récepteurs $\alpha 1$ et $\alpha 2$, et entraînent une redistribution du sang circulant vers les muscles et le cerveau (Mormède, 1995).

Les catécholamines accroissent également la quantité d'oxygène disponible pour les cellules par l'augmentation de la fréquence et de la profondeur des mouvements inspiratoires, et de la quantité d'érythrocytes circulants par contraction splénique (Mormède, 1988 et 1995).

d- Les actions sur la thermorégulation

d-1. Les actions sur la thermogenèse avec frissons

La thermogenèse peut être le fruit de plusieurs mécanismes chez les mammifères : par le maintien du tonus musculaire, par les contractions musculaires due à l'exercice ou au frisson, par l'activité métabolique. Seule l'activité métabolique est soumise à une régulation nerveuse autonome. L'activation du système nerveux sympathique provoque une mobilisation des réserves glucidiques et lipidiques qui seront oxydées et produiront une quantité modérée de chaleur. De plus l'adrénaline stimule la formation réticulée du système nerveux central et par conséquent la réaction d'éveil et le niveau d'activité générale de l'organisme. On voit donc que le système nerveux sympathique participe peu à la thermogenèse avec frissons.

d-2. Les actions sur la thermogenèse sans frisson

Certains mammifères ont la particularité d'être pourvus de tissu adipeux brun : les animaux nouveau-nés, ceux habitués à l'exposition au froid et ceux qui hibernent. Ce tissu est constitué d'adipocytes de petite taille et de coloration beige à brune en raison de leur quantité de cytochromes. Ces cellules sont très riches en mitochondries dans les membranes internes desquelles se trouve un grand nombre de protéines appelées thermogénines. Il s'agit d'un transporteur qui abolit le gradient de protons et s'oppose à la production d'ATP. Le tissu adipeux brun a de très grosses capacités d'oxydation mais peu de capacités de production d'ATP : il produit donc une très grande quantité de chaleur. Ce tissu adipeux brun reçoit une innervation sympathique dont l'activation a un pouvoir calorigène très important (Combrisson 2003/2004).

4. La mise en jeu du système nerveux sympathique lors d'un stress

a- Mise en jeu lors d'un stress aigu

Lors d'un stress aigu, par exemple la préhension par le manipulateur si on considère un animal de laboratoire tel un rat ou une prise de sang si on considère un bovin, la concentration plasmatique des catécholamines augmente très rapidement, de façon très importante mais pendant un laps de temps très court.

Un exemple chez le un rat porteur d'un cathéter veineux à demeure (Mormède, 1988) :

- Concentration plasmatique basale : adrénaline 100 pg/ml noradrénaline 200 pg/ml
- Concentration plasmatique après manipulation : adrénaline 900 pg/ml noradrénaline 400 pg/ml

Ceci témoigne de la nature nerveuse de l'activation qui se fait en quelques secondes mais s'estompe également très rapidement puisque les catécholamines ont une demi-vie très brève de l'ordre de la minute.

Lors d'un stress, l'organisme réagit de manière non spécifique à la stimulation émotionnelle comme dans la situation décrite ci-dessus où il n'y a pas de mise en danger de l'homéostasie du rat. Alors l'adrénaline et la noradrénaline sont toutes les deux libérées en plus grande quantité. Par contre on observe parfois une différence entre la sécrétion de noradrénaline et d'adrénaline. Ainsi Picotti et al, 1981 (d'après Mormède, 1988) décrivent une libération spécifique de la noradrénaline en réponse à une exposition au froid chez le rat tandis que Castagne et al., 1987 (d'après Mormède, 1988) constatent une libération spécifique d'adrénaline en réponse à une hypoglycémie insulinique toujours chez le rat. Dans ces deux cas le système sympathique est mis en jeu plutôt de manière spécifique vis-à-vis stimulus stressueur afin de conserver la chaleur corporelle par vasoconstriction périphérique (action de la noradrénaline sur les récepteurs α_1) dans un cas et dans l'autre de provoquer la glycolyse pour rétablir la glycémie (action de l'adrénaline sur les récepteurs α_1 et β_2).

b- Mise en jeu lors d'un stress chronique

Lors d'un stress chronique, une contrainte de logement telle la surpopulation par exemple, l'activation récurrente du système nerveux sympathique s'accompagne d'une augmentation progressive et durable de l'activité des enzymes de synthèse des catécholamines dans les médullo-surrénales et les ganglions sympathiques (Lemaire, 1993). Cependant il n'y a pas à l'heure actuelle de technique simple, ne nécessitant pas le sacrifice de l'animal et utilisable en routine, pour évaluer l'activité de ces enzymes. D'autre part les caractéristiques de la libération des catécholamines (pulsatilité et fugacité) ne permettent pas de mettre en évidence un stress chronique. L'alternative serait de s'intéresser aux catécholamines excrétées par voie urinaire et/ou à leurs catabolites. C'est la méthode utilisée en médecine humaine pour mettre en évidence une hyperactivation du système sympathique notamment en présence de phéochromocytome, une tumeur sécrétrice de la glande médullo-surrénale (Mormède, 1995). Cette technique a été utilisée par Mormède et al. dans un premier temps chez le rat puis a été appliquées chez le porc (Hay et Mormède, 1997a). En effet la quantité de catécholamines urinaires reflète alors l'activation du système nerveux sympathique sur une assez longue période qui gomme un éventuel stress aigu occasionné par le prélèvement lui même. Les données sur le système sympathique et le stress chez les animaux domestiques de rente restent encore assez floues malgré les études menées sur les porcs.

Nous avons présenté le système nerveux sympathique et son fonctionnement, et vu dans quelle mesure il était activé lors de stress aigu ou chronique. Dans une seconde partie de notre revue bibliographique nous envisagerons comment l'analyse de ce système peut nous permettre de mettre en évidence une situation de stress aigu ou chronique.

D- L'axe corticotrope et sa mise en jeu lors de stress

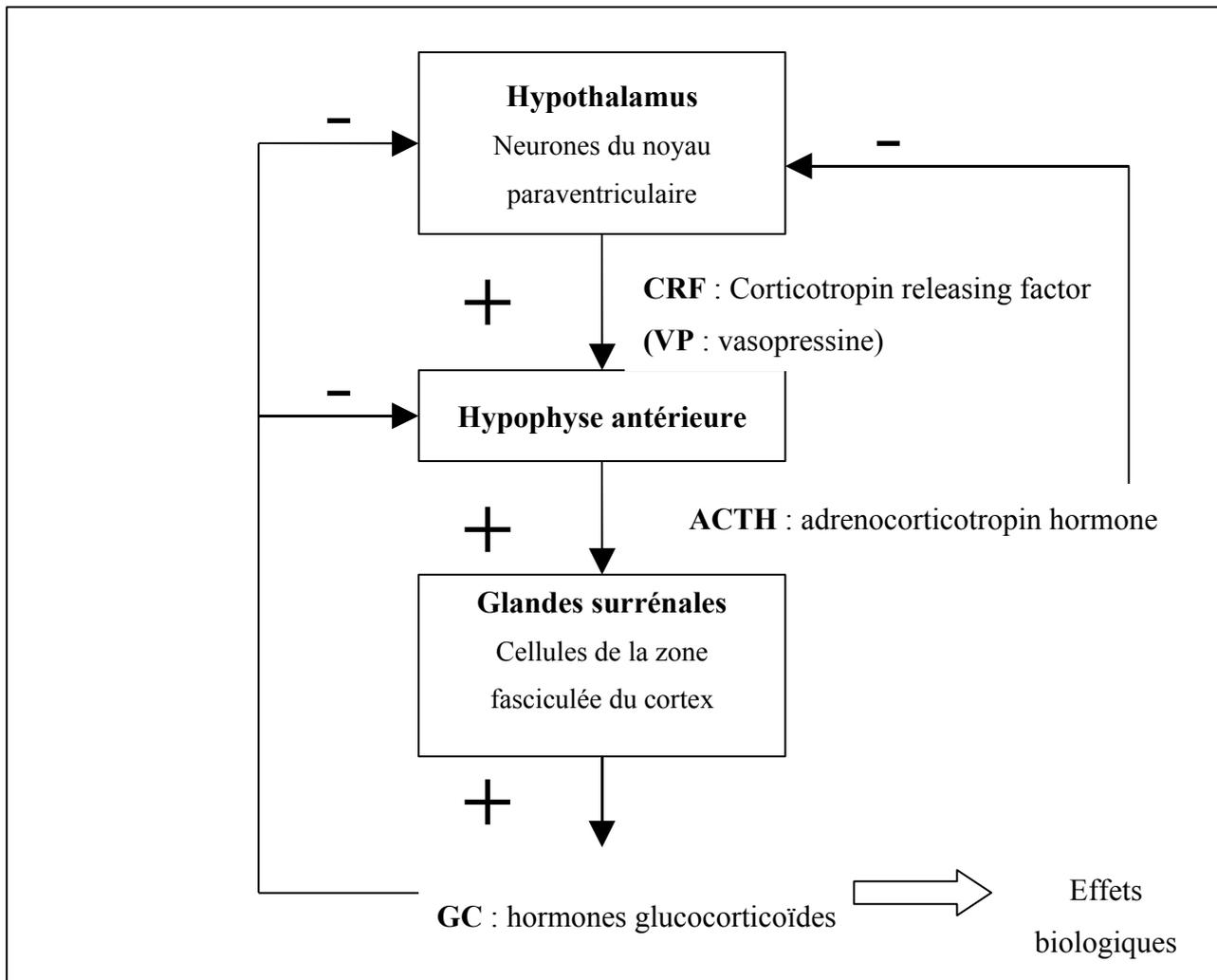
L'axe corticotrope est associé au stress pour la première fois par Selye (1976). En effet il constate que diverses expériences menées sur des animaux de laboratoire provoquent l'apparition d'une triade de symptômes parmi lesquels une augmentation de la taille des glandes surrénales. Puis il définit le stress comme la réponse non spécifique de l'organisme à toute agression qui lui est faite et cette réponse non spécifique se caractérise par une activation de l'axe corticotrope auquel appartiennent d'ailleurs les glandes surrénales. A partir de ces travaux et constatations, on a considéré comme du stress toute activation de l'axe corticotrope traduite par une élévation des concentrations plasmatiques des hormones corticostéroïdes. Ce dogme est aujourd'hui reconnu comme abusif. Cependant il est vrai de dire que l'axe corticotrope joue un rôle important dans la réaction de stress. Pour cette raison il est important de connaître précisément son organisation et son fonctionnement afin de reconnaître les effets du stress d'une activation physiologique de cet axe.

1. Organisation de l'axe corticotrope et régulation

a- Organisation de l'axe corticotrope

L'axe corticotrope est aussi appelé hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien. Cette dénomination illustre les différentes structures impliquées. Les hormones glucocorticoïdes (principalement cortisol et corticostérone) sont de nature lipidique et synthétisées à partir d'un précurseur unique : le cholestérol, dans le cortex surrénalien au niveau des cellules de la zone fasciculée. La synthèse et la libération de ces hormones sont sous le contrôle de l'hypothalamus *via* l'hypophyse comme présenté sur la Figure 7.

Figure 7 : Organisation schématique de l'axe corticotrope



Les neurones du noyau paraventriculaire projettent leur axone au niveau de la zone externe de l'éminence médiane, au contact des capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire. Ils libèrent au niveau de leur synapse, directement dans le flux sanguin, un neuropeptide appelé CRF pour *corticotropin releasing factor*. L'existence de ce neurotransmetteur, qui assujettit l'hypophyse à l'hypothalamus, est pour la première fois évoqué par Harris en 1940, puis confirmé par Guillemin et Schally en 1955 (d'après Mormède, 1995). Il n'est toutefois isolé et identifié qu'en 1981 comme un peptide de 41 acides aminés qui a la propriété de fortement stimuler la sécrétion d'ACTH ou *AdrenoCorticoTropin Hormone* par l'anté-hypophyse. On retrouve le CRF et ses récepteurs dans d'autres zones du cerveau (hippocampe, amygdale et cortex cérébral) ainsi que dans la peau, le cœur ou au niveau du tractus gastro-intestinal (Miller et O'Callaghan, 2002), ce qui suggère d'autres rôles du CRF notamment dans les mécanismes de l'anxiété, de l'apprentissage et de la mémoire, ainsi que dans la réaction comportementale lors de stress. Le CRF exerce également un effet trophique sur les cellules corticotropes de l'hypophyse aboutissant, lors d'une hyper-

exposition chronique, à une augmentation du pourcentage de cellules corticotropes dans l'hypophyse.

La vasopressine semble également moduler la sécrétion d'ACTH soit directement, soit en potentialisant l'action de la CRF (Mormède, 1995). L'importance relative des différentes hormones est variable selon l'espèce et la situation d'activation. Par exemple Minton (1994) rapporte les observations faites par Pradier et coll. (1986) qui constatent que chez le mouton la vasopressine a plus d'effet que le CRF sur la sécrétion d'ACTH tandis que chez les autres espèces étudiées (rats, bovins et porcs) on note un effet plus important de la CRF par rapport à la vasopressine. On observe également une synergie de la vasopressine et de la CRF dans la stimulation de la sécrétion d'ACTH tout en agissant sur des récepteurs différents (Miller et O'Callaghan, 2002).

Enfin Whitnall rapporte en 1993 (d'après Minton, 1994) que des cytokines telles les interleukines 1 et 6 et le TNF (*tumor necrosis factor*), semblent être capables d'activer la sécrétion d'ACTH lors d'infection systémique ou d'inflammation.

L'ACTH est le second maillon de l'axe. Il s'agit d'un peptide de 39 acides aminés synthétisé par les cellules corticotropes à partir d'un précurseur appelé *pro-opio-mélanocortine* ou POMC, qui a la particularité d'engendrer également par différents clivages, la β -endorphine et les hormones mélanotropes. L'ACTH est un peptide assez bien conservé au niveau interspécifique puisque les 24 premiers acides aminés sont constants chez toutes les espèces et suffisent à engendrer les effets biologiques de l'hormone. Elle agit sur les cellules corticosurréaliennes par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire couplé à l'adénylcyclase. Cette activation a pour effet de stimuler fortement la sécrétion d'hormones glucocorticoïdes mais aussi minéralocorticoïdes par les glandes surrénales. L'ACTH exerce aussi un rôle trophique vis-à-vis du cortex surrénalien. Lors d'hypersécrétion chronique, on assiste à une hyperplasie du cortex due à une augmentation du nombre de cellules corticales (Hay, 1999). A noter qu'un déficit en ACTH provoque l'effet inverse. De plus les surrénales sont très sensibles à de faibles variations d'ACTH. En effet Zhang et al. (1990) ont montré qu'une faible dose de CRF entraîne une très discrète augmentation de l'ACTH mais une forte augmentation du cortisol plasmatique (d'après Hay, 1999). Cependant lorsque la dose de CRF augmente, la concentration d'ACTH continue à augmenter proportionnellement tandis que la cortisolémie plafonne quelle que soit la dose de CRF. Cependant la sécrétion de glucocorticoïdes est prolongée par rapport à celle de l'ACTH.

Les glucocorticoïdes sont le maillon effecteur de l'axe corticotrope. Ce sont des hormones lipidiques issues de la transformation du cholestérol. Les deux principales hormones sont le cortisol et la corticostérone qui sont inégalement représentées au sein des différentes espèces animales. Le cortisol est l'hormone essentielle chez l'homme, les bovins, les ovins, le chien, le porc tandis que c'est la corticostérone qui domine chez la poule, le rat ou le lapin (Mormède, 1988). Ces hormones sont présentes dans le sang majoritairement sous forme liées à l'albumine (liaison non spécifique) et à la transcortine (liaison spécifique) mais seule la forme libre, largement minoritaire, est active.

b- Régulation de l'axe corticotrope

Les régulations de l'axe corticotrope sont d'abord le fait de l'axe corticotrope lui-même. Le CRF lorsqu'il est maintenu à concentration élevée dans le système porte hypophysaire provoque une désensibilisation des récepteurs, limitant ainsi l'activité d'une stimulation ultérieure (Mormède, 1988). On peut penser que le caractère pulsatile de la sécrétion de CRF limite cette désensibilisation dans les conditions physiologiques. Les glucocorticoïdes représentent le principal facteur d'inhibition de l'axe corticotrope. Ils exercent un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion d'ACTH, de CRF mais aussi au niveau des centres nerveux supérieurs via la présence de récepteurs au niveau de l'hypophyse, du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et de l'hippocampe dans le système limbique.

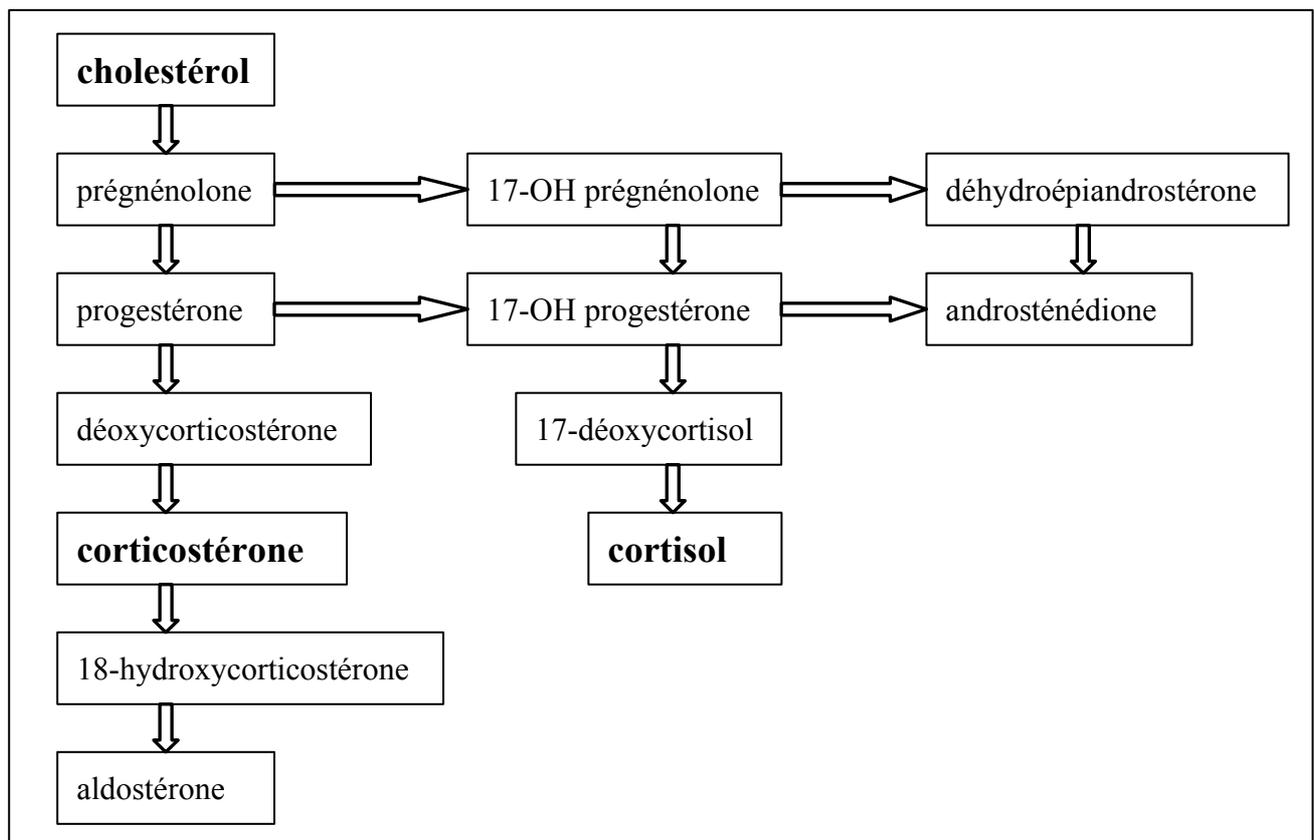
D'autre part, comme tous les axes neuroendocriniens, l'axe corticotrope est sous le contrôle des centres nerveux supérieurs et a, avec eux, des connections anatomiques : le noyau paraventriculaire reçoit des fibres noradrénergiques issues du tronc cérébral. Les catécholamines centrales joueraient plutôt un effet stimulant sur l'axe corticotrope ainsi que la plupart des neurotransmetteurs (acétylcholine, adrénaline, noradrénaline, histamine). Seul le GABA (*γ-aminobutyric-acid*) exerce un effet inhibiteur.

2. Synthèse, libération et dégradation des glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont synthétisés dans les cellules corticales des glandes surrénales à partir du cholestérol comme illustré dans la Figure 8. Ce cholestérol est obtenu après l'hydrolyse d'ester du cholestérol par une enzyme activée par phosphorylation par l'adényl cyclase (point de régulation de la synthèse par l'ACTH).

Puis le cortisol (ou corticostérone selon l'espèce) est libéré de façon pulsatile avec une périodicité de 50 à 200 minutes en fonction de l'espèce et des individus (Lefcourt et coll, 1993 étude chez la vache dont la périodicité des pics de libération est de 120 minutes). La cortisolémie varie selon un rythme circadien dont le maximum survient juste avant la période d'activité à savoir le matin pour les espèces diurnes et le soir pour les nocturnes. Ce rythme est dû à des différences d'amplitudes des pics de libération de cortisol plutôt qu'à des différences de fréquence (Windle et al, 1998 d'après Hay, 1999).

Figure 8 : Chaîne de synthèse des corticostéroïdes



La demi-vie du cortisol est de 60 à 90 minutes et celle de la corticostérone est de 50 minutes. Puis ils sont métabolisés principalement au niveau du foie notamment par réduction. Les métabolites ainsi obtenus subissent une glucurono-conjugaison et dans une moindre mesure une sulfo-conjugaison avant d'être éliminés par voie urinaire. D'autre part une fraction du cortisol est convertie en cortisone qui est inactive sur les récepteurs cellulaires puis la cortisone est dégradée et éliminée de la même façon que le cortisol.

3. Actions des glucocorticoïdes

a- Mécanismes d'action à l'échelle cellulaire

Les glucocorticoïdes (GC) sont des hormones lipidiques et comme telles agissent par l'intermédiaire de récepteurs intracellulaires après que leur forme libre a traversé la membrane plasmique. La molécule se fixe alors à son récepteur qui s'active et se transloque dans le noyau cellulaire au niveau du génome. Le couple hormone-récepteur se fixe alors sur l'ADN au niveau de sites spécifiques de régulation de certains gènes parmi lesquels le gène de l'hormone de croissance par exemple. Il existe deux types de récepteurs aux GC. Les récepteurs de type I (ou rénaux ou récepteurs aux minéralocorticoïdes MR) possèdent une très forte affinité pour les GC tandis que les récepteurs de type II (ou hépatiques ou récepteurs aux glucocorticoïdes GR) ont une affinité environ dix fois moins importante pour les hormones glucocorticoïdes (De Kloet et al, 1998 d'après Hay, 1999). A des concentrations basales, les GC se lient préférentiellement aux MR tandis que lorsque leur concentration augmente ils se lient aux GR. Au niveau du rein, l'enzyme 11 β -hydroxystéroïde-deshydrogénase convertit le cortisol en cortisone inactive et les minéralocorticoïdes sont ainsi les ligands majoritaires du MR dans cet organe.

b- Actions biologiques des hormones glucocorticoïdes

La première action importante est l'action néoglucogénique. Les GC augmentent la production de glucose à partir de substrats non glucidiques et notamment à partir des protéines. A court terme, les GC permettent l'augmentation de l'énergie disponible pour l'organisme par la mise en circulation de glucose. Cependant ce processus se fait aux dépens des protéines dites de structure, indispensables à l'organisme, et une hypercortisolémie chronique a pour conséquence une amyotrophie, une ostéoporose et une moindre efficacité des défenses immunitaires (d'après Mormède, 1988), des signes bien connus lors d'hypercorticisme iatrogène ou syndrome de Cushing. De plus les GC ont un effet anti-insulinique en limitant l'entrée de glucose dans les cellules de certains tissus. Ainsi la glycémie peut être un indicateur de l'activité de l'axe corticotrope. A noter que la glycémie est elle aussi sujette à des variations circadiennes.

Les GC agissent sur le système immunitaire en modifiant la numération et formule leucocytaire. De leur action résulte une neutrophilie accompagnée d'une éosinopénie, et d'une lymphopénie (Mormède, 1988). On observe plutôt une diminution des lymphocytes T suppresseurs et une baisse de l'activité des cellules NK tandis que les lymphocytes B ne semblent pas modifiés par les glucocorticoïdes (Golub et Gershwin, 1985). Cependant il existe de grandes variations

interspécifiques et on distingue des espèces « cortico-sensibles » telles le rat ou le lièvre, dont les populations lymphocytaires sont très sensibles aux GC, et des espèces dites « cortico-résistantes » comme le porc. A noter que les bovins seraient assez peu sensibles au GC (Roth, 1985 d'après Lauffenburger 1999) et leur formule leucocytaire ne serait modifiée de façon importante que lors de concentrations importantes de GC.

Enfin les glucocorticoïdes modulent la réaction inflammatoire selon deux mécanismes. Le premier est l'inhibition de la synthèse et de la libération de cytokines proinflammatoires par les macrophages et les monocytes. Le second est l'activation de la synthèse d'une protéine, la lipocortine, qui a pour effet d'inhiber la phospholipase A, enzyme essentielle à la formation des leucotriènes et des prostaglandines puisqu'elle permet la formation de leur précurseur : l'acide arachidonique.

4. Mise en jeu de l'axe corticotrope lors de stress

a- Mise en jeu lors d'un stress aigu

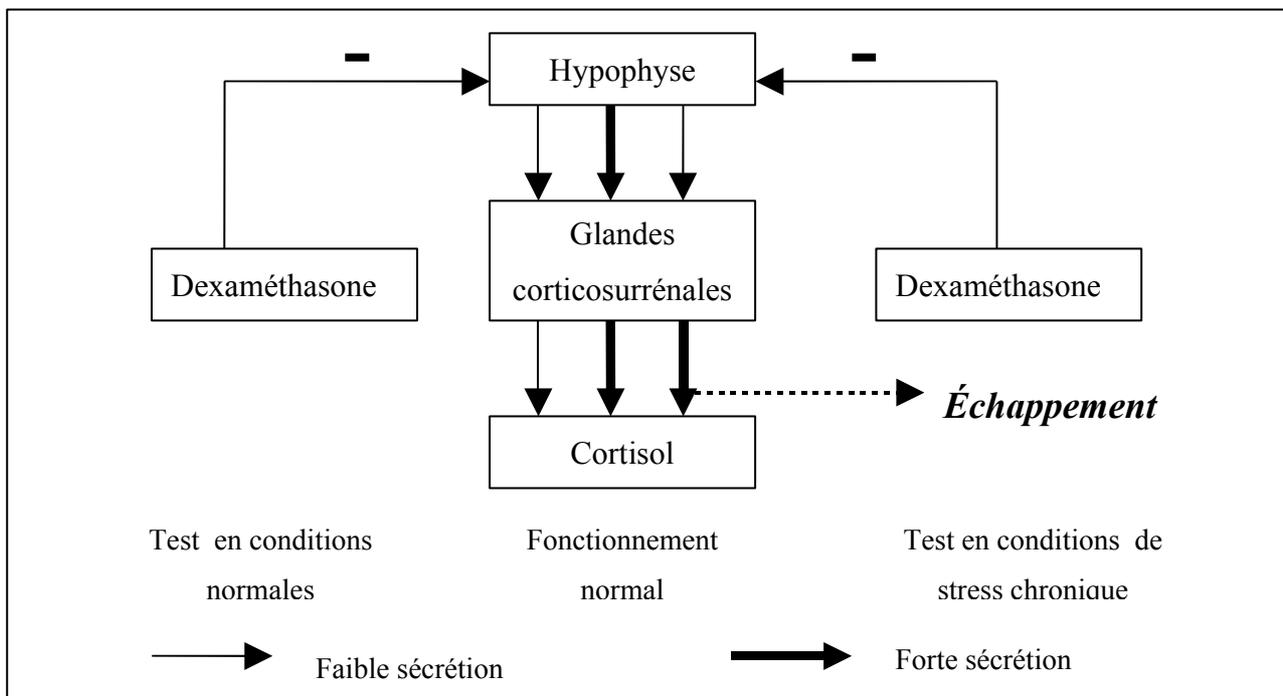
Lors de stress aigu, l'hypothalamus, sous le contrôle des centres nerveux supérieurs, produit une décharge de CRF dont l'intensité est proportionnelle à celle du stress. Cette décharge provoque une décharge d'ACTH elle-aussi proportionnelle et modérée. En effet face à des stimulations modérées, les variations plasmatiques de l'ACTH sont très discrètes voire indétectables. Enfin les glandes surrénales, maillon terminal de l'axe, expriment leur très grande sensibilité à l'ACTH et produisent une sécrétion importante de corticostéroïdes (dont le cortisol chez les espèces qui nous intéressent) qui entraîne une augmentation flagrante et facilement détectable de la cortisolémie. Lorsque l'intensité du stimulus stressueur augmente, la cortisolémie plafonne rapidement tandis que la concentration plasmatique de l'ACTH continue à augmenter proportionnellement. Lors de stress de faible intensité, les perturbations de l'axe corticotrope sont discrètes et ne peuvent pas être identifiées par des valeurs ponctuelles de cortisolémie. Ainsi Barnett et al. (1981) (d'après Mormède, 1988), n'ont pas mis en évidence d'augmentation de la cortisolémie chez des porcs isolés du groupe social mais une disparition du cycle nyctéméral et une diminution de la transcortine plasmatique (protéine de transport spécifique du cortisol) dont la synthèse est régulée négativement par les corticostéroïdes. D'autre part on constate, lors de stress aigu, une augmentation de la concentration du cortisol dans la salive ou corticosialie, directement proportionnelle à celle de la cortisolémie mais le rapport corticosialie sur cortisolémie est très faible (0,065) en fait un indicateur moins sensible que la cortisolémie.

b- Mise en jeu lors d'un stress chronique

Lorsque la stimulation de l'axe corticotrope est durable (Mormède, 1995), les variations des concentrations d'hormones (cortisol et ACTH) circulantes deviennent très discrètes et indétectables à l'échelle individuelle du fait de leurs variations physiologiques spontanées.

On observe en revanche des conséquences de l'hyperactivité de l'axe, comme une hyperréactivité des glandes surrénales à l'ACTH. En effet l'ACTH, comme nous l'avons vu précédemment, exerce une action trophique vis-à-vis du cortex surrénalien et une activation prolongée entraîne une hypertrophie des glandes. Un exemple nous est décrit par Mormède, Bluthé et Dantzer (1983) chez le veau (d'après Mormède, 1988). Un lot de veaux est mis à l'engrais à l'attache en cases individuelles. Huit jours après l'allotement, on note une augmentation importante de la cortisolémie, accompagnée d'une hyperglycémie par rapport à un lot de veaux témoins élevés librement en groupe. Des mesures ont été réitérées 6 semaines après l'allotement et ces différences ne sont plus détectables. Cependant on observe une hyperréactivité de la surrénale à l'ACTH mise en évidence par un échappement à la dexaméthasone (voir Figure 9).

Figure 9 : Principe du test de freination à la dexaméthasone et échappement au test lors de stress chronique



Le test à la dexaméthasone permet d'évaluer la fonction surrénalienne. La dexaméthasone est un corticoïde de synthèse qui, injecté chez un organisme, provoque les mêmes réactions et rétrocontrôles qu'un corticoïde endogène. Ainsi la dexaméthasone exerce un rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse dont la conséquence est la chute de la concentration plasmatique de l'ACTH puis la chute de la cortisolémie. Dans des conditions physiologiques, l'injection de dexaméthasone entraîne une diminution de la cortisolémie. Cependant en situation de stress chronique, le cortex surrénalien est hypertrophié et même une faible quantité d'ACTH circulant provoque une sécrétion importante de cortisol. Donc on ne voit pas de chute de la cortisolémie suite à une injection de la même quantité de dexaméthasone.

Par ailleurs on peut également observer, en situation de stress chronique, une atrophie du thymus (Mormède, 1995). Nous retrouvons ici deux des éléments constitutifs de la triade observée par Selye.

Nous avons vu l'organisation et le fonctionnement de l'axe corticotrope, ainsi que sa mise en jeu lors de situations de stress. Certaines des manifestations que nous avons détaillées pourront être utilisées pour mettre en évidence une situation de stress comme nous l'aborderons dans la seconde partie de cette revue bibliographique.

Conclusion de la première partie de la revue bibliographie

L'animal domestique, et notamment l'animal de rente, est soumis par ses conditions de vie et d'élevage à de multiples stimuli tant internes qu'externes. Une fois un stimulus intégré, le système nerveux central évalue sa nocivité pour l'homéostasie de l'organisme par rapport à ses propres caractéristiques mais aussi par rapport à la mémoire, l'expérience, le statut physiologique et les caractéristiques individuelles de l'animal. Ainsi un même stimulus peut être, ou non, considéré comme un stressor avec une variabilité due au stimulus, à l'espèce, à l'individu, à son statut physiologique et à son expérience. Les deux principaux systèmes biologiques mis en œuvre lors d'un stress qu'il soit chronique ou aigu, sont le système nerveux sympathique, associé à la glande médullosurrénale, et l'axe corticotrope. Ils sont tous deux activés par le système nerveux central responsable de l'intégration de l'information et de l'organisation de la réaction de stress. L'activation du système sympathique est rapide et fugace, et se caractérise par la libération de noradrénaline au niveau des synapses des neurones post ganglionnaires et d'adrénaline dans le flux sanguin circulant. Les conséquences biologiques sont une augmentation des fréquences cardiaques et respiratoires et de la pression artérielle. De plus on observe une augmentation de l'hématocrite

due à une contraction splénique et une redistribution du flux sanguin des territoires périphériques vers les territoires qui vont être mis en jeu dans les réactions comportementales à savoir les muscles et le cerveau. On peut également signaler un effet lipolytique et une participation à l'épuisement des réserves glucidiques. L'activation de l'axe corticotrope se fait rapidement mais ses effets sont plus durables. Elle permet notamment la mise à disposition de l'organisme d'une plus grande quantité « d'énergie circulante » sous forme de glucose, en stimulant la néoglucogénèse. Elle a également pour conséquence à long terme une hypertrophie du cortex surrénalien qui conditionne une hyperréactivité de l'axe corticotrope.

Ces deux grands systèmes subissent de notables modifications lors de stress. Nous nous attacherons dans une seconde partie à déterminer si ces modifications ou d'autres manifestations du stress peuvent nous servir de révélateurs d'une situation de stress afin de pouvoir les utiliser comme marqueurs au cours d'évaluation de différentes situations où un stress est suspecté.

II. Les marqueurs de stress

Une fois le terme et la notion de stress définis le plus précisément possible, il s'agit d'identifier des paramètres qui selon leurs modifications nous permettraient de déterminer la présence ou non d'un stress dans certaines situations. En effet nous l'avons abordé dans la première partie, le stress est très souvent utilisé pour déterminer le bien-être animal. Les chercheurs qui travaillent sur ce sujet considèrent qu'un animal est « bien » s'il n'est pas stressé. Ils ont donc besoin d'indicateurs du stress. Ces paramètres ont été déterminés à partir des modifications connues de l'organisme lors de stress. Parmi eux on peut distinguer des indicateurs comportementaux, des indicateurs biologiques, des indicateurs biochimiques. Nous essayerons, le plus souvent possible, de souligner les marqueurs du stress utilisables chez les bovins, dans un souci de cohérence avec la partie expérimentale de notre travail.

A. Les marqueurs comportementaux du stress

Le comportement normal d'un animal est appelé éthogramme. Tout comportement qui diffère de l'éthogramme peut être considéré comme anormal. Pour pouvoir considérer un comportement particulier comme indicateur de stress, quatre conditions sont requises d'après Ewbank (1985) :

- le stresser doit être identifié (et quantifié si possible),

- la réponse biochimique (sympathique et/ou corticotrope) doit être quantifiée et si possible corrélée avec le « niveau » du stresser et le degré de la réponse comportementale,
- les changements de comportement doivent être flagrants, complètement décrits et quantifiés,
- une atteinte au bien-être physique ou mental de l'animal doit avoir été démontrée.

Ewbank (1985) précise ainsi qu'un comportement anormal, seul, ne peut pas être un marqueur de stress. Nous voyons ici la première limite de l'usage du comportement comme marqueur du stress puisqu'il faudra de toute façon confirmer la présence du stress par la mise en évidence d'une réponse biochimique. Cependant il apparaît intéressant dans certaines situations de relever les comportements anormaux provoqués par le stress notamment dans un souci de sécurité pour les manipulateurs des animaux. Il est pertinent de distinguer les réactions comportementales associées avec un stress aigu de celles associées à un stress chronique, notamment parce qu'elles sont tout à fait différentes.

1. Les marqueurs comportementaux d'un stress aigu

Cannon (1929) a décrit les deux principaux types de réactions lors d'un stress aigu à savoir la fuite (flight) ou l'affrontement (fight). Broom et Johnson (1993) décrivent des changements d'orientation des animaux afin de mieux orienter leurs organes des sens, des changements posturaux, des arrêts de l'activité en cours, une immobilisation. Le plus souvent des vocalisations accompagnent ces comportements. Ils rapportent l'exemple du poulet qui, lorsqu'il entend un bruit inhabituel ou particulièrement fort, cesse de manger, lève la tête, pousse un cri, s'immobilise et fait face au stresser. Le même type de comportement peut être rapporté dans les autres espèces de rente telles les bovins, les ovins ou les porcs.

Les signes comportementaux précédemment décrits semblent assez peu spécifiques d'un individu, d'une espèce, ou d'une situation. De plus, de nombreux paramètres peuvent influencer ces comportements, à commencer par l'individu. L'éleveur et le vétérinaire en ont bien l'habitude lorsqu'ils manipulent les animaux, le même geste (une prise de sang ou de température) pratiqué sur deux animaux du même lot ne provoquera pas la même réaction : l'un relèvera simplement la tête tandis que l'autre essaiera de taper le manipulateur ou de s'échapper. Un autre comportement souvent associé à un stress aigu est la défécation. Lors de l'arrivée du vétérinaire dans la stabulation ou de la présence d'une personne étrangère lors de la traite, les vaches ont tendance à bouser mais comment relier ce fait de façon certaine à un stress ? Il s'agit d'une fonction physiologique normale et il est difficile de l'associer systématiquement avec un stress.

L'aspect social est un paramètre important (Veissier et coll., 1997) puisque le même animal ne réagira pas de la même façon s'il est dominant ou dominé, ainsi que s'il est seul ou en groupe. Par exemple un veau élevé seul et sans aucun contact avec des congénères est beaucoup plus réactif à un stimulus extérieur (un jet d'eau en l'occurrence) qu'un veau élevé parmi ses congénères ou même bénéficiant juste de contacts visuels et /ou physiques.

Nous voyons donc que les réactions comportementales aux stress sont certes intéressantes comme indices d'un stress mais elles sont beaucoup trop variables pour nous permettre de les utiliser comme véritables marqueurs d'un stress.

2. Les marqueurs comportementaux d'un stress chronique

La présence d'un stress chronique chez les animaux de rente est un des aspects les plus étudiés au sujet du bien-être animal. En effet on sait, et il est aisé de comprendre, qu'une intervention humaine ponctuelle provoque un stress aigu chez l'animal. Celui-ci est de courte durée et ne porte en général pas préjudice à l'animal, le seul risque étant souvent pour le manipulateur lui même. Par contre les conditions et techniques d'élevage modernes sont des sources de stress chronique et on cherche à détecter la présence et le niveau de stress afin de le diminuer de façon à ce qu'il ne porte pas préjudice à l'animal ni à sa valeur économique.

Les stéréotypies sont définies par Odberg (1978) (d'après Veissier, 1997) comme « des activités répétitives, invariantes et sans fonction évidente ». La principale manifestation comportementale du stress chronique est l'apparition de stéréotypies que Dantzer (1994) associe à la non réalisation des besoins comportementaux spontanés. Il donne les exemples des porcs qui mâchonnent et lèchent ou des veaux qui font des « jeux de langue » (Veissier et al., 1998). Ces stéréotypies appelées également « tics » représentent une déviation d'un comportement naturel qui ne peut pas être réalisé. Cependant même si ces stéréotypies sont aisées à repérer, elles le sont beaucoup moins à quantifier et encore moins à associer à un stresser particulier puisque ce sont le plus souvent l'ensemble des conditions d'élevage qui participe à leur mise en place.

Ainsi les marqueurs comportementaux du stress chronique semblent plus réguliers tout au moins au sein d'une même espèce. Cependant ils ne constituent pas non plus un bon marqueur de stress même si ils représentent un signe d'alerte pour l'éleveur ou l'éthologue s'inquiétant de la présence de stress dans l'élevage.

B- Les marqueurs biologiques du stress

Est considéré comme marqueur biologique toute fonction de l'organisme modifiée par le stress et évaluée de la façon la moins invasive possible. Nous distinguerons une fois de plus les marqueurs de stress aigu et les marqueurs de stress chronique.

1. Les marqueurs biologiques d'un stress aigu

a- Le système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire est le reflet du fonctionnement du système nerveux sympathique. Ainsi les modifications du rythme cardiaque et de la pression artérielle nous serviront de marqueurs de l'activation du système nerveux autonome. Le premier et le plus simple de ces marqueurs est le rythme cardiaque. Il est soumis au contrôle du système nerveux sympathique à effet tachycardisant, et parasympathique (*via* le nerf X vague) plutôt bradycardisant. Lors d'un stress aigu, le rythme cardiaque peut ralentir si les animaux ont peur mais le plus souvent les animaux de rente présentent une tachycardie (Broom, 2003). Elle peut être mesurée par auscultation directe si les animaux sont habitués à être manipulés régulièrement afin que l'opération en elle-même ne déclenche pas un stress. Stephens et Toner (1975) proposent d'équiper un veau avec des électrodes percutanées, le rythme cardiaque étant alors transmis par télémétrie. Une autre solution serait d'utiliser un dispositif portatif non invasif qui se fixe sur le dos des animaux, comme l'équipement de certains chiens dont on enregistre l'électrocardiogramme sur 24 heures. Cette troisième solution ne peut se faire que sur des animaux isolés pour éviter que les « jeux » entre animaux ne débranchent ou n'abîment le dispositif. La fréquence cardiaque normale d'un veau de 2 à 4 mois est autour de 90 battements par minutes (bpm) et Stephens et Toner (1975) observent une élévation jusqu'à 145 bpm lorsque le veau présente un stress. La tachycardie est associée à l'activation du système nerveux sympathique.

b- L'appareil respiratoire

Le rythme respiratoire est augmenté lors de stress aigu, du fait d'une activité physique accrue ou d'une émotion intense (Broom et Johnson, 1993). L'intérêt de ce marqueur est sa simplicité d'observation. En effet il n'est pas nécessaire d'entrer en contact avec les animaux ni

même de les approcher de près pour l'évaluer. La fréquence respiratoire d'un bovin peut être obtenue en observant les mouvements des flancs de l'animal, préférentiellement le flanc droit afin de ne pas être perturbé par les contractions du rumen. Sur des animaux adultes il peut être moins facile de visualiser les mouvements respiratoires du fait de leur faible fréquence (12 à 20 chez un bovin adulte) et de la conformation des individus. Il est en outre nécessaire que ce soit le même observateur qui fasse les relevés avant, pendant et après le stress dans un souci de reproductibilité.

c- La température corporelle

La température interne d'un animal varie naturellement au cours de la journée notamment en relation avec l'activité, l'état d'éveil ou le degré de digestion. Elle est en général plus basse le matin. La température est un paramètre clef de l'homéostasie. En effet la température extérieure offre une large gamme de variations (45°C à -40°C pour les valeurs extrêmes) et l'organisme doit en permanence ajuster sa température interne en fonction des échanges thermiques et des productions de chaleur interne dues à la respiration cellulaire. Différentes études ont été menées (d'après Broom et Johnson, 1993) et ont pour la plupart mis en évidence une élévation de la température corporelle lors de stress aigu chez des rats (Georgiev, 1978), des singes (Reite, 1981) ou des veaux (Trunkfield, 1991), notamment lors de la montée dans un véhicule, d'un transport ou avant l'abattage. On peut faire la même observation lorsque, au cours de l'examen clinique d'un chien, on relève une température de 39°C en l'absence de toute pathologie. On considère cette valeur comme normale par rapport aux 38,5°C généralement admis et cette tolérance est autant due à la variabilité individuelle qu'au fait que la manipulation en elle-même provoque un stress et donc une augmentation de la température de l'animal. Cependant on peut également observer une baisse locale de la température lors d'un stress, lorsque l'activation du système sympathique se traduit par une vasoconstriction périphérique. Pour éviter ce biais il suffit de prendre la température par voie rectale, et non la température tympanique, afin de bien relever la température interne de l'organisme et ne pas se contenter d'une température périphérique. L'intérêt de ce marqueur est sa simplicité de mise en œuvre notamment chez des bovins puisque c'est un geste non invasif et non douloureux qui en général ne déclenche pas de réaction de la part de l'animal.

2. Les marqueurs biologiques d'un stress chronique

Le stress chronique, on l'a vu précédemment, peut avoir de larges influences sur l'organisme. Elles sont moins flagrantes que pour un stress aigu mais leurs conséquences sont plus néfastes. Il s'agit de mettre en évidence les effets des pressions d'élevage par exemple sur une population animale.

a- Le système cardiovasculaire

Le rythme cardiaque comme nous venons de le voir peut être le marqueur d'un stress aigu mais n'est d'aucun intérêt lors d'un stress chronique. La pression sanguine est un paramètre difficile à évaluer parce que cela nécessite souvent une intervention invasive, à savoir la pose d'un cathéter artériel, qui peut engendrer un stress aigu et interférer avec les mesures. La mesure de la pression artérielle chez des primates (Herd et al., 1969, d'après Broom et Johnson, 1993) et des rongeurs de laboratoire (Lamprecht et al., 1973, Henry et al., 1975) lors de situations de stress chronique ont mis en évidence des augmentations significatives en relation avec l'activation prolongée du système nerveux sympathique. Ce marqueur pourrait être intéressant à utiliser si on disposait d'une méthode non invasive et fiable de mesurer la pression artérielle. C'est le cas aujourd'hui chez le chat et le chien, à l'aide d'un brassard comparable à celui utilisé en médecine humaine et d'un doppler, mais ce système n'a pas été adapté à l'espèce bovine.

b- La croissance

Un des premiers signes d'appel lorsqu'un animal ou un lot est malade ou mal à l'aise dans son environnement –et donc stressé– est l'arrêt ou le ralentissement de la croissance chez les jeunes et la perte de poids chez les adultes. Cette observation clinique a été largement démontrée dans des études sur des rongeurs de laboratoire (Taché et al., 1978, Mormède et al., 1990 d'après Broom et Johnson, 1993) qui perdaient rapidement du poids lors de situations de stress chronique comme le brassage et la reformation fréquente des lots d'animaux. Cependant le même type d'études menées chez les bovins (Lensink et al., 2000, Veissier et al., 2001) ne montre pas de différences significatives entre les lots en situation de stress et les témoins. Veissier et al. (2001) ont montré par exemple que des veaux soumis à de multiples changements de lot n'avaient pas une moins bonne croissance que des veaux témoins n'ayant jamais changé de lot. On note ici que la croissance peut-être un excellent marqueur de stress chez les rongeurs de laboratoire mais pas chez les bovins. On voit ainsi une variabilité d'espèce parmi les marqueurs et il conviendra lors de notre étude de choisir des marqueurs du stress plus judicieux chez les bovins.

c- La reproduction

Les performances de reproduction sont des marqueurs intéressants parce qu'elles sont assez simples à appréhender. Broom et Johnson (1993) observent que les conflits hiérarchiques perturbent la reproduction par exemple chez la vache en limitant les comportements d'oestrus notamment. Les performances de reproduction sont appréciées à partir de durées : durée entre le vêlage et la première insémination, durée entre le vêlage et l'insémination fécondante, ou à partir du nombre d'inséminations nécessaires pour obtenir une gestation chez une vache.

Dobson et Smith (2000) ont étudié les mécanismes à l'origine d'un défaut de fertilité chez des vaches laitières. Cette étude fait suite à l'observation que certaines pathologies, telles qu'une hypocalcémie post-partum, un kyste ovarien, une mammite ou une boiterie, entraînaient une dépréciation des paramètres de fertilité : allongement de 6 à 15 jours de l'intervalle vêlage-1^{ère} IA, de 12 à 80 jours de l'intervalle vêlage-IA fécondante et une augmentation de 0,5 à 1,9 IA nécessaires pour obtenir une gestation. Ils suggèrent que le stress réduit la fertilité parce qu'il interfère avec la synchronisation des événements présidant à l'ovulation à savoir la sécrétion pulsatile de GnRH et le pic de LH. Tilbrook et al. (2000) soulignent le rétrocontrôle négatif qu'exerce l'axe corticotrope sur l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Le stress aurait comme conséquence d'inhiber la fonction reproductrice en supprimant la sécrétion de gonadotrophines. Dobson et Teeble JE (2000) décrivent également une baisse de la fertilité, notamment en cas de synchronisations de chaleurs, lors de transports répétés ou de réallottements fréquents. On note que le stress peut également affecter la fertilité ou le comportement sexuel des mâles qui peuvent refuser de saillir lorsqu'ils ont peur par exemple (Broom et Johnson, 1993).

Les performances de reproduction sont donc un excellent marqueur de stress chronique d'origine sociale (conflits hiérarchiques, réallotement), psychologique (transport) ou physique (pathologie). Cependant les critères de reproduction peuvent être influencés par de très nombreux autres facteurs dont le facteur humain (repérage des chaleurs par exemple). Il est alors important d'utiliser avec discernement les critères de reproduction comme marqueurs de stress notamment dans des élevages dont on connaît la bonne technicité de l'éleveur. De plus ces critères ne peuvent s'utiliser que sur des animaux pubères, et dont on maîtrise la reproduction. Ils sont par exemple inutilisables chez la chienne, dont le cycle sexuel est de 6 mois, ou chez des jeunes animaux (veaux).

d- La santé et la longévité

Ce concept est généré par l'observation d'animaux sauvages mis en captivité. Des tortues, par exemple, qui vivent près de 20 ans dans leur milieu naturel, ont une espérance de vie de 2 ans en captivité (Warwick, 1989 d'après Broom et Johnson, 1993). En ce qui concerne les animaux de rente on ne considère pas l'espérance de vie réelle mais l'espérance de vie économique puisque ces animaux sont abattus dès qu'ils ne sont plus économiquement rentables. Pour être économiquement rentable une vache laitière doit avoir une bonne lactation, ne pas avoir de mammites et être gestante facilement. En ce sens tout ce qui peut limiter l'une de ces données peut réduire l'espérance de vie économique. Nous l'avons vu précédemment le stress déprécie les performances de reproduction. De plus, une étude de Giesecke (1985) décrit l'incidence du stress sur la santé de la mamelle des vaches laitières. La lactation d'un Vache Laitière Haute Productrice (VLHP), comme une Prim'holstein, est considérée comme un stress majeur pour l'organisme dans son ensemble et pour la mamelle en particulier. En effet certaines races ont été sélectionnées pour produire une lactation démesurée en quantité et en durée. Celle-ci représente une demande très importante, en glucose notamment, pour l'organisme et le met ainsi en situation de stress chronique. La mamelle présente alors un syndrome d'épuisement et l'épithélium mammaire est sensibilisé à l'action des catécholamines. Ses défenses naturelles sont affaiblies et prédisposent la vache aux mammites limitant ainsi son espérance de vie économique.

Enfin le stress est souvent mentionné comme co-facteur dans le déclenchement de maladie. Des travaux chez l'homme (Miller et O'Callaghan, 2002) l'incriminent dans le déclenchement de désordres psychiatriques, de maladies inflammatoires chroniques, d'asthme, de maladies cardiaques et de désordres myoarthrosquelettiques. Le stress est suspecté d'être à l'origine d'un certain nombre de maladies chez les animaux également. Miller et Weiss ont montré l'apparition d'ulcères gastriques lors de stress chez le rat (d'après Henry et Stephens-Larson, 1985). Le nombre d'ulcères de la caillette est également un critère régulièrement utilisé comme marqueur de stress lors d'étude chez le veau (Veissier et al. 1998, Lensink et al., 2000).

Ainsi le stress peut limiter de plusieurs manières l'espérance de vie économique d'un animal de rente. Ce marqueur de stress chronique peut être utilisé à l'échelle du troupeau plutôt qu'à l'échelle de l'individu. En effet il semble plus pertinent d'envisager un problème de stress chronique dans un élevage qui a un fort taux de renouvellement et un troupeau plutôt jeune. Là encore ce marqueur est à corrélérer avec le niveau sanitaire du troupeau et la technicité de l'éleveur.

Nous avons donc vu que de nombreux marqueurs biologiques peuvent être utilisés pour évaluer un stress, chronique ou aigu. Cependant nous avons également mis en évidence que tous ces paramètres ne sont pas toujours facilement utilisables sur le terrain, dans toutes les espèces animales et dans toutes les conditions d'études. En effet nombre d'entre eux sont sujets à l'interprétation de l'observateur et sont à corrélés avec les conditions d'élevages des animaux. Une fois de plus on ne peut se contenter d'un seul marqueur pour évaluer le stress d'un individu ou d'un lot et il est nécessaire d'en utiliser plusieurs si possible concordants.

C- Les marqueurs biochimiques

Parmi les changements intervenant chez un organisme lors d'un stress on rappelle l'activation de l'axe corticotrope et du système nerveux sympathique. Celle-ci se traduit notamment par l'augmentation de la sécrétion de plusieurs hormones et neurotransmetteurs parmi lesquels on compte le cortisol, l'adrénaline ou la noradrénaline. Le stress a été associé, dans un premier temps, à une élévation de la concentration du cortisol plasmatique (Selye, 1976). Nous allons voir quels sont les paramètres biochimiques pouvant servir de marqueurs de stress et dans quelles conditions.

1. Les marqueurs biochimiques d'un stress aigu

a- Les marqueurs dus à l'activation du système nerveux sympathique

L'adrénaline et la noradrénaline sont sécrétées lors de l'activation du système sympathique par un stressor (cf le I de cette revue bibliographique). Cependant l'étude de leurs variations plasmatiques est délicate : (i) la libération des catécholamines dans la circulation sanguine est rapide et fugace du fait de leur demi-vie courte, (ii) leur sécrétion est également sujette à des variations spontanées importantes et (iii) le système sympathique est sensible au moindre stimulus. De fait, si on veut étudier les variations plasmatiques des catécholamines lors d'un stress aigu, il est nécessaire de mettre en place des conditions expérimentales spécifiques (Hay, 1999) comme la pose de cathéters veineux à demeure et l'intervention d'un seul expérimentateur auquel les animaux sont habitués. On observe lors d'un stress aigu une augmentation des taux plasmatiques de catécholamines. On dispose de peu d'études utilisant les concentrations plasmatiques des catécholamines et donc de peu de résultats, notamment chez les bovins.

A titre d'illustration on peut citer un exemple mené chez le rat par Kvetnansky et al. en 1978 (d'après Broom et Johnson, 1993). Ils ont soumis des rats munis d'un cathéter veineux à un choc physique et mis en évidence des taux plasmatiques d'adrénaline et de noradrénaline respectivement multipliés par 40 et par 6. Un autre exemple est donné chez des veaux lors du sevrage par Lefcourt et Elsasser (1995). Ils constatent également une élévation des taux de noradrénaline (+30%) et d'adrénaline (+70%) mais dans une moindre mesure. De plus ils soulignent que les variations périphériques des catécholamines sont très peu marquées chez les bovins par rapport à d'autres espèces comme les rats ou les ovins. Mellor et al. (2002) ont étudié les variations de cortisol, d'adrénaline et de noradrénaline chez des agneaux soumis à une castration et une coupe de queue et chez des veaux soumis à un écornage, à partir de 5 minutes après l'intervention. Ils constatent un pic du taux plasmatique de noradrénaline 10 à 30 minutes après l'intervention. Par contre, le pic d'adrénaline est faible ou non significatif. Ils attribuent cette dernière observation au fait que la première prise de sang se fait 5 min après l'intervention, délai qui serait trop long pour pouvoir observer le pic précoce de l'adrénaline. Ils avaient en outre choisi de faire des prises de sang toutes les 10 minutes plutôt que munir leurs animaux de cathéters parce que le prélèvement sanguin est plus rapide de la sorte (15s contre 1 min). Enfin la méthode utilisée lors des deux dernières études pour doser les catécholamines est la chromatographie en phase liquide à haute pression ou HPLC. C'est la méthode de routine aujourd'hui et celle que nous avons utilisée lors de notre travail personnel. Nous en exposerons le principe dans la partie expérimentale de notre travail.

Ainsi on comprend que les variations des taux plasmatiques de catécholamines sont des marqueurs très sensibles et corrélés à l'intensité du stresser mais ils sont délicats d'utilisation et d'un intérêt limité chez les bovins.

b- Les marqueurs dus à l'activation de l'axe corticotrope

L'activation de l'axe hypothalamo-hypophysio-corticosurrénalien lors d'un stress se traduit par la sécrétion plasmatique d'ACTH puis de cortisol (ou corticostérone suivant l'espèce considérée). La plupart des études sur le stress utilisent le taux de cortisol plasmatique comme marqueur.

Parmi les plus récentes, Mellor et al. (2002) décrivent les variations du cortisol lors d'intervention douloureuse chez des veaux et des agneaux (même expérience que citée précédemment). Ils utilisent pour chaque type d'animaux un lot témoin à qui ils appliquent les mêmes manipulations sans le geste douloureux. Ainsi, si on considère les veaux, alors qu'un lot est écorné, le lot témoin est placé dans les mêmes conditions de contention et les manipulateurs

exercent une pression autour des cornillons. Cette organisation leur a permis d'évaluer la réaction à la contention séparément de celle liée à l'écornage proprement dit. L'observation du lot témoin montre que l'augmentation de la cortisolémie en réponse à un stress aigu est différée dans le temps et que l'individu est encore en situation physiologique de stress longtemps après que le stresser a disparu. L'observation du lot écorné montre aussi un pic de cortisolémie qui intervient au même moment que le témoin mais à une valeur près du double de celle du lot témoin. Elle reste également à un niveau élevé plus longtemps que chez le lot témoin. Ainsi on voit que l'importance de la réponse « cortisol » à un stress est corrélée en valeur et en durée à l'intensité du stresser.

De plus le cortisol peut également être dosé dans la salive (Mormède, 1988). Son taux est alors au moins deux fois plus faible que dans le sang mais il présente une excellente corrélation avec ce dernier puisque seul le cortisol libre diffuse jusqu'aux glandes salivaires. Les dosages de cortisol se font selon deux méthodes : la RIA, ou méthode radioimmunologique, et l'EIA, ou méthode immuno-enzymologique.

La réponse en ACTH lors d'un stress aigu a été étudiée notamment par Veissier et al. (1999). Un stress aigu est « mimé » par l'administration de doses croissantes de CRH (+/- vasopressine) par voie veineuse à des veaux. La réponse en ACTH intervient plus tôt que la réponse en cortisol. De plus ils constatent également que le pic de cortisol atteint un maximum mais s'élargit avec l'augmentation de la dose de CRH et donc du stimulus. Le pic d'ACTH par contre ne semble pas avoir de valeur maximale et continue à croître avec la dose de CRH, mais la persistance du pic n'augmente pas. On voit ici la labilité de la réponse en ACTH. L'ACTH ne peut être dosé que dans le plasma car sa nature peptidique lui interdit la diffusion passive à travers les membranes.

Ainsi les concentrations plasmatiques de cortisol et d'ACTH sont des marqueurs du stress aigu assez simples d'utilisation. Les dosages se font facilement en routine. Les variations de l'ACTH imposent des prises de sang à intervalles très rapprochés pour être interprétables, puisqu'elles sont limitées dans le temps. On peut préférer poser un cathéter pour éviter le biais de la contention pour la prise de sang (Hay, 1999). Les variations du cortisol interviennent par contre plus tardivement et leur persistance est plus longue. Cependant si on veut vraiment corréler la réponse en cortisol à l'intensité du stresser il est nécessaire de considérer l'aire sous la courbe car le pic est d'autant plus long que le stimulus est intense. Enfin il apparaît qu'il est toujours nécessaire de comparer un lot expérimental avec un lot témoin soumis à la même contention de façon à réellement évaluer le stress provoqué par l'intervention étudiée et pas celui provoqué par la contention et l'intervention.

c- Autres paramètres utilisés comme marqueur de stress aigu

c-1 Les β -endorphines

Les β -endorphines sont des opioïdes endogènes synthétisés dans le système nerveux central et l'hypothalamus par clivage de la pro-opiomélanocortine (POMC) comme l'ACTH. Cooper et al. (1995) rapportent une élévation de la sécrétion de β -endorphine chez le mouton lors de situations variées de stress (Rodway et al. 1993). On observe la même élévation chez la vache au vêlage (Aurich et al. 1993 et Hydbring et al. 1999). Pour Broom (2003), les β -endorphines varient de la même façon que l'ACTH ou le cortisol et Bradshaw (1996) montre une élévation de leur taux plasmatique chez le porc lors de stress aigu. Cependant Cooper et al. (1995) n'observent pas de variation des β -endorphines plasmatiques lors de l'écornage de bouvillons. Le dosage des β -endorphines est simple (RIA à double anticorps) et il n'a pas été montré de variations circadiennes dans leur sécrétion. Cependant les β -endorphines ne sont pas validées comme marqueur de stress chez les bovins et sont sujettes au même biais que le cortisol, à savoir leur augmentation suite au stress de la contention nécessaire au prélèvement sanguin.

c-2 La progestérone

La progestérone est une hormone stéroïde sexuelle produite notamment chez la femelle mammifère par le corps jaune. Cooper et al. (1995) rapportent une élévation du taux de progestérone plasmatique chez la vache stressée possédant un corps jaune actif et chez la brebis ovariectomisée ou non. De plus ils mettent en évidence une élévation significative du taux plasmatique de progestérone chez des bouvillons soumis au stress de l'écornage. Les concentrations de progestérone sont mesurées par RIA à double antigène sur prélèvement sanguin. Il apparaît dans cette étude que le taux de progestérone est moins sensible à la contention que le taux de cortisol. En effet la différence entre les taux de progestérone du lot témoin (soumis uniquement à la contention) et du lot écorné est plus importante que celle entre les taux de cortisol. Ainsi la progestérone apparaît un marqueur intéressant du stress puisque sa sensibilité est telle qu'on fait aisément la différence entre le stress dû à la contention et le stress dû à l'opération.

2. Les marqueurs biochimiques d'un stress chronique

a- Les marqueurs dus à l'activation du système nerveux sympathique

Les caractéristiques de sécrétion des catécholamines (réactivité, labilité et pulsatilité) en font de très mauvais marqueurs d'un stress chronique. Par contre nous avons vu que l'activation régulière et soutenue du système nerveux sympathique entraîne une augmentation progressive et durable de l'activité des enzymes de synthèse des catécholamines dans les glandes médullosurrénales et les ganglions sympathiques (Mormède et al. 1990, Lemaire et al. 1993, Hay, 1999). Les enzymes dont on détecte une augmentation de l'activité sont la TH (tyrosine hydroxylase) et la PNMT (phenylethanolamine N-méthyltransférase). Des techniques de dosage ont été développées chez les animaux de laboratoire. On peut décrire des méthodes par compétition visant à évaluer le taux de renouvellement de noradrénaline à partir de la vitesse de disparition d'un traceur (noradrénaline radioactive par exemple) et plus récemment la RT-PCR comparative qui permet une évaluation quantitative (Kvetnansky et al. 2004). Cependant les différentes méthodes employées nécessitent le sacrifice des animaux afin de prélever les glandes surrénales et les ganglions sympathiques.

L'activation chronique du système sympathique ne peut pas être détectée par une augmentation des taux plasmatiques de catécholamines. Cependant elle a pour conséquence un relargage fréquent d'une quantité assez importante de catécholamines qui seront dégradées. La principale voie de d'élimination des catécholamines et de leurs métabolites étant la voie urinaire, il apparaît donc intéressant d'utiliser les concentrations urinaires de catécholamines comme marqueurs d'un stress chronique (Hay, 1999). En effet les mesures urinaires reflètent l'activation du système sympathique sur une large période (entre deux mictions) et en gomme l'aspect pulsatile. D'autre part elles ne sont pas biaisées par le stress généré par la contention et le prélèvement. De plus la collecte d'urine est un geste facile, pas ou peu invasif et utilisable sur un grand nombre d'individus. Les catécholamines urinaires sont dosées par HPLC, après purification, avec une détection électrochimique. Les différentes catécholamines et leurs métabolites sont identifiés par leur temps de rétention. Les valeurs obtenues sont corrélées au taux de créatinine urinaire (mesuré au préalable) afin de lever le biais créé par la variabilité des intervalles entre la dernière miction de l'individu et la collecte. Ce procédé a l'avantage de permettre la collection des urines à n'importe quel moment de la journée. Ainsi le dosage des catécholamines et de leurs métabolites dans l'urine est assez simple à mettre en œuvre sur le terrain et sur un nombre important d'animaux qui restent vivants (Hay et Mormède, 1997a).

b- Les marqueurs dus à l'activation de l'axe corticotrope

Les concentrations plasmatiques de cortisol et d'ACTH subissent peu de variations lors d'activation chronique de l'axe corticotrope (Mormède, 1995). Les caractéristiques de leur sécrétion (pulsatilité et rythme circadien) et le biais créé par la contention et le prélèvement sanguin rendent ces variations indétectables sur une mesure ponctuelle (Hay 1999). Cependant l'accumulation des mesures permet de mettre en évidence une diminution des variations circadiennes et un « lissage » des cortisolémies au cours de la journée (études par Janssens et al. 1995 chez le porc et par Przekop et al. 1985 chez la brebis). La cortisolémie basale ne semble pourtant pas être un marqueur facilement utilisable en routine pour mettre en évidence un stress chronique.

La cortisolémie citée dans la partie précédente n'est pas envisageable comme marqueur puisque ces valeurs sont 10 fois moindres que celles de la cortisolémie. On se heurtera donc au même problème que pour celle-ci.

Nous avons également vu dans la première partie que l'ACTH exerçait un rôle trophique sur la glande surrénale et lors d'une activation chronique de l'axe corticotrope on peut observer une augmentation du poids de celle-ci (mis en évidence chez le rat par Lemaire et al. 1993). Cependant cette mesure nécessite le sacrifice de l'animal.

On peut également mettre en évidence les modifications structurales dues à l'activation chronique de l'axe corticotrope par des tests dynamiques de stimulation et de freination (Veissier et al. 1988, 1997). Le test de freination met en œuvre le rétrocontrôle qu'exercent les hormones corticoïdes sur l'axe corticotrope par le biais de l'hypophyse. Pour cela on utilise un puissant corticoïde de synthèse, la dexaméthasone, qui freine de façon sélective la synthèse et la libération d'ACTH et par conséquent abaisse la cortisolémie environ 14h après l'injection (Veissier et Le Neindre 1988). Lors de stimulation chronique de l'axe corticotrope on observe un « échappement » c'est-à-dire que la cortisolémie ne diminue pas ou peu, suivant les individus en réponse à l'injection de dexaméthasone.

Il existe également deux tests de stimulation. Le premier fait intervenir la réponse du cortex surrénalien à l'ACTH. On injecte par voie intramusculaire de l'ACTH et on observe en réponse un accroissement de la cortisolémie dès 10 min et jusqu'à 180 min après l'injection chez les bovins (Veissier et Le Neindre 1988). Lors de stimulation chronique de l'axe corticotrope on observe une augmentation de la sensibilité du cortex surrénalien à l'ACTH qui se traduit par une augmentation plus forte de la cortisolémie (Veissier et al. 1997, Lensink et al. 2000). Le protocole généralement mis en œuvre chez le veau est le suivant : injection de dexaméthasone à 20 µg/kg de poids vif le premier après le repas du soir (18h), puis une injection d'ACTH IV après le repas du matin (9h).

Les prises de sang sont faites avant chaque injection et 30 et 180 minutes après l'injection d'ACTH (Veissier et al. 1997, 1998, 2001 et Lensink et al. 2000). Le second test de stimulation met en jeu la réponse de l'ensemble de l'axe corticotrope à une injection de CRH (Veissier et al. 1999). L'augmentation de l'ACTH (10 min après l'injection) et du cortisol (20 min après l'injection) plasmatiques montrent respectivement la réactivité de l'hypophyse et du cortex surrénalien. Les deux réponses seront exacerbées en cas de stress chronique.

Enfin un autre moyen d'évaluer l'activation chronique de l'axe corticotrope est, comme pour les catécholamines, la mesure des glucocorticoïdes urinaires et de leurs métabolites. La voie urinaire est leur principale voie d'excrétion, et les mesures urinaires affranchissent du caractère circadien de leur libération puisque la période de stockage est en général assez longue. De plus comme nous l'avons déjà vu, le prélèvement urinaire est un geste simple et peu stressant pour l'animal. Le cortisol urinaire résulte de l'ultrafiltration du sang et sa concentration est très bien corrélée à la concentration plasmatique de cortisol libre. A l'heure actuelle la plupart des études dosent préférentiellement le cortisol urinaire plutôt que ses métabolites du fait d'une meilleure information et du perfectionnement des techniques de laboratoire (Hay, 1999). Les techniques de référence sont les dosages par chromatographie (notamment HPLC) après extraction, couplés à une détection par absorption UV autour de 240 nm (bonne spécificité), par fluorimétrie (meilleure sensibilité) ou par spectrométrie de masse (meilleures spécificité et sensibilité mais coûteuse). Des techniques immuno-chimiques sont également envisageables sous réserve de disposer d'un anticorps spécifique du cortisol ne présentant pas de réaction croisée avec la cortisone qui est également largement excrétée dans les urines. Comme pour les catécholamines il est nécessaire de corréler les valeurs de cortisol urinaire à celles de la créatinine afin de lever le biais dû aux différences de temps d'accumulation de l'urine avant prélèvement.

c- Les marqueurs issus de l'axe thyroïdien

L'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien est en partie responsable des phénomènes de croissance de l'organisme. Il s'agit d'un système plutôt anabolique et les hormones thyroïdiennes sont des facteurs de croissance reconnus pour la croissance tissulaire. Pour évaluer l'axe thyroïdien on dose habituellement la triiodothyronine, ou T3, qui est l'hormone active sur les tissus périphériques. Cependant elle n'est présente qu'en quantité très modérée dans le sang circulant : c'est la thyroxine, ou T4, qui représente la principale forme de transport. Ces deux hormones sont en partie liées à des protéines plasmatiques, et on peut en doser la fraction libre ou la totalité. L'axe corticotrope interagit avec l'axe thyroïdien comme le précisent Kühn et al. (1998). Ils rapportent qu'une activation de l'axe corticotrope inhibe la fonction thyroïdienne chez les vertébrés adultes.

Cependant ils observent également que chez le fœtus, ou l'embryon, les hormones glucocorticoïdes provoqueraient plutôt une augmentation de T3 circulant, notamment en ayant un effet activateur de la transformation de T4 en T3 (observations faites chez le fœtus de mouton et l'embryon de poulet). Des études ont montré des variations des taux plasmatiques d'hormones thyroïdiennes lors de stress aigu d'origine hyperthermique (Magdub et al. 1982) ou hypothermique (Godfrey et al. 1991). On comprend aisément que celles-ci contribuent à lutter de façon spécifique contre le stressor qu'est la température extrême puisque l'axe thyroïdien est un régulateur de la production de chaleur dans l'organisme. Helmreich et al. (2006) se sont intéressés aux modifications des hormones thyroïdiennes circulantes lors de stress chronique causé par des coups répétés administrés à des rats. Ils mettent en évidence une chute du taux plasmatique de T3 suite à la situation de stress chronique provoquée chez ces rats. D'autre part Fazio et al. (2005) montrent que des taurillons limousins présentent une légère augmentation des hormones thyroïdiennes (libres et totales) après un court trajet en camion et une forte augmentation lors d'un long trajet. Ce sont des situations de stress respectivement aigu et chronique. Chez les bovins des modifications des taux plasmatiques de T3 et T4 semblent être assez facilement les témoins d'une situation de stress chronique. Leur dosage est facile puisqu'il se fait par une méthode immuno-enzymatique en routine. De plus les hormones thyroïdiennes ne sont pas sujettes à des variations circadiennes.

Conclusion de la seconde partie de la revue bibliographique

Nous avons mis en évidence le fait que de très nombreux paramètres peuvent être utilisés pour évaluer la présence d'un stress, qu'il soit aigu ou chronique. Ils n'ont pas tous la même pertinence, et le même marqueur peut être mieux adapté à une situation chronique qu'à une situation aiguë ou inversement. De plus ils sont souvent sujets à interprétation, en prenant en compte le contexte et les animaux observés. L'idée majeure de cette partie est qu'il ne faut pas se limiter à n'utiliser qu'un seul marqueur pour affirmer qu'un stress existe ou non. Seule l'accumulation d'indices convergents nous permet d'aboutir à une conclusion. Les marqueurs comportementaux sont très faciles à observer mais difficiles à interpréter ; les marqueurs biologiques sont simples à observer et un peu moins difficiles à interpréter ; quant aux marqueurs biochimiques ils sont plus ou moins contraignants à observer mais leur interprétation est plus facile et moins sujette aux variations individuelles. Il est nécessaire de considérer plusieurs marqueurs, de différents types.

Conclusion de la revue bibliographique

Le stress est l'ensemble des réponses non spécifiques d'un organisme à un stimulus, qualifié de stressor, susceptible de mettre en péril son homéostasie. Le stress est une réaction physiologique de l'organisme afin de se protéger et de s'adapter à son environnement. Mais il peut également être néfaste lorsqu'il est exacerbé. Le stress met en jeu des structures sensibles internes ou externes qui perçoivent le stimulus, des structures nerveuses centrales qui intègrent l'information et organisent les réponses, et des systèmes biologiques effecteurs. Il s'agit notamment du système nerveux sympathique dont l'activation se traduit par la sécrétion de noradrénaline au niveau des ganglions post-synaptiques de la chaîne nerveuse orthosympathique, et d'adrénaline par les glandes médullosurrénales. Ces catécholamines et leurs métabolites sont utilisés comme marqueurs biochimiques du stress aigu lorsqu'ils sont dosés dans le sang et du stress chronique lorsqu'ils sont dosés dans les urines. Les dosages se font généralement par chromatographie liquide haute pression. Intervient également l'axe corticotrope avec comme maître d'œuvre l'hypothalamus et dont l'activation se traduit par une augmentation de la synthèse d'ACTH par l'hypophyse, et d'hormones glucocorticoïdes (dont le cortisol) par les glandes corticosurrénales. Le dosage immuno-enzymatique du cortisol plasmatique est un bon indicateur du stress aigu tandis que celui du cortisol urinaire ainsi que les épreuves dynamiques sur l'axe corticotrope nous renseignent sur l'état de stress chronique. D'autres marqueurs tels le rythme cardiaque, la température corporelle ou le comportement et la santé des animaux sont de bons indicateurs de stress mais plus difficiles à interpréter. Nous choisirons dans la seconde partie un certain nombre de ces marqueurs afin d'évaluer l'état de stress chronique chez des génisses Prim'Holstein issues de clonage somatique et âgées de 0 à 18 mois.

Deuxième partie : Dosage de certains marqueurs du stress chez 10 clones et 15 témoins

Introduction – Situation du sujet

On fait naître des bovins clonés depuis près de 25 ans et ce par divers procédés.

Le premier veau cloné est né en 1982 par la technique de bissection embryonnaire (Ozil et al. 1982). C'est la technique la plus simple qui reproduit le phénomène qui donne naissance aux jumeaux homozygotes (ou vrais jumeaux). Il s'agit de couper en deux par micromanipulation l'embryon au stade morula ou blastocyste. Puis on replace chaque « demi-embryon » dans une zone pellucide et on les transfère dans une ou deux vaches porteuses synchronisées. Ozil et al. (1982) rapportent un taux de gestation de 64% par cette méthode dont la principale limite est le nombre d'individus obtenus : deux.

Puis la technique de transfert de matériel chromosomique nucléaire a été mise au point, d'abord à partir de cellules embryonnaire totipotentes (morula) chez le mouton (Willadsen, 1986). Le principe est de transférer le matériel génétique dans un ovocyte dépourvu, au préalable, de son noyau. Les cellules embryonnaires souches sont toutes indiquées pour être donneuses de noyau puisqu'elles ont la caractéristique de ne pas être différenciées du tout. Cependant elles ne sont pas facilement accessibles dans toutes les espèces et le nombre de cellules donneuses de noyaux est limité. En effet on utilise des embryons en stade préimplantatoire (morula) à 32 ou 64 blastomères. Le premier veau issu de transfert nucléaire de cellule embryonnaire est né en 1989 (Prather et al. 1987). Pour disposer d'une source plus large de cellules donneuses de matériel génétique on a voulu utiliser des cellules somatiques, et donc différenciées, provenant d'un fœtus ou d'un adulte. La problématique était de savoir si des cellules engagées dans un processus de différenciation (cellules de la peau ou du cumulus ovocytaire par exemple) allaient pouvoir « revenir en arrière » et redevenir pluri- voire totipotentes. Le premier mouton cloné par transfert nucléaire à partir d'une cellule somatique est né en 1997 et s'appelait Dolly (Wilmut et al., 1997). Depuis de nombreuses espèces ont été clonées à l'aide de cette technique à partir de diverses lignées cellulaires. A l'heure

actuelle la technique de clonage par transfert nucléaire est couramment utilisée et a permis de produire un grand nombre de bovins clonés dans le monde et en France.

Avec l'augmentation du nombre de bovins clonés, des observations faites par diverses équipes de recherche à travers le monde ont montré des anomalies de développement lors des gestations puis de la vie néonatale des veaux clonés. Lorraine et al. (1998) et Heyman et al. (2002) ont notamment mis en évidence des anomalies de croissance des annexes et organes fœtaux regroupées sous le nom de Large Offspring Syndrome ou LOS (syndrome du gros veau). De plus la mortalité néonatale des veaux clonés est anormalement élevée avec l'apparition d'atrophie thymique ou d'infection organique sévère telles des ruminites (Chavatte-Palmer et al. 2004).

Un clone est « un ensemble d'individus génétiquement identiques ». Les observations de différentes équipes ont depuis longtemps infirmé l'idée que ces individus sont également phénotypiquement identiques, des « copies conformes » comme c'est le cas dans l'imaginaire collectif. Cependant il est aujourd'hui établi que le clonage est compatible avec la production d'individus physiologiquement normaux, ayant une croissance et une production (viande ou lait) normales et capables de donner naissance par reproduction sexuée à des individus normaux. Ils pourraient donc être aptes, à entrer dans la filière alimentaire, si l'on peut montrer que ce sont des animaux totalement normaux.

Une étude a été entreprise par l'INRA (Institut National de Recherche Agronomique), l'INA-PG (Institut National d'Agronomie de Paris-Grignon) et l'ENVA (Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort) en 2002 afin d'expertiser la qualité des bovins issus de clonage somatique. Elle vise à évaluer les risques alimentaires, sanitaires, nutritionnels, allergiques ou toxiques que pourraient représenter ces animaux ou leurs produits s'ils entraient dans la chaîne alimentaire. L'étude est menée en grande partie à l'Unité expérimentale de Bressonvilliers (91) où sont nés et sont élevés les bovins clonés. Cette étude comprend 4 volets et notre travail s'inscrit dans celui orienté sur l'étude clinique des clones. Les premières observations cliniques des veaux issus de clonage ont montré que certains paramètres cliniques et biologiques étaient modifiés lors de la période néonatale (de la naissance à 2 mois) (Chavatte-Palmer 2002).

Suite à ce premier constat, notre travail s'est organisé autour du fait que les jeunes veaux clonés ont montré, dans leurs premiers jours de vie, un certain nombre d'anomalies. On a observé une plus forte mortalité, un nombre plus important de maladies sévères (Chavatte-Palmer et al. 2004), des hyperthermies paradoxales (Chavatte-Palmer communication personnelle) et de légères modifications des concentrations plasmatiques de l'hormone thyroïdienne T4 par rapport à des

témoins issus de la fécondation (Chavatte-Palmer 2002). Une hypothèse plausible serait une plus grande sensibilité des animaux clonés au stress, puisque celui-ci est un facteur favorisant de l'apparition de maladies et peut se manifester, notamment, par une augmentation de la température interne. Le but de notre travail est d'évaluer si les bovins clonés manifestent un niveau de stress plus important que les témoins avec qui ils ont été élevés. Pour répondre à cette question nous nous sommes appuyés sur des marqueurs biologiques et biochimiques du stress, observés de la période néonatale jusqu'à l'âge de 18 mois. De plus nous nous sommes intéressés au niveau plasmatique des hormones thyroïdiennes, qui sont l'un des principaux facteurs de variations de la température interne d'un individu non malade.

I. Animaux, Matériels et Méthodes

A- Animaux

Les animaux utilisés dans cette étude sont des génisses de race Prim'Holstein, clones ou témoins, de la naissance à 18 mois. Les témoins sont des génisses issues d'insémination artificielle. Les clones sont issus de deux lignées cellulaires adultes de génotype différent.

1. Méthodes d'obtention des individus clonés

Il existe plusieurs méthodes pour obtenir un clone. La première, historiquement, mise en œuvre est la bissection embryonnaire qui consiste à couper par micromanipulation un embryon au stade morula ou blastocyste en deux et à replacer chacun des morceaux dans une zone pellucide vide. Chaque nouvel embryon est alors transplanté dans une vache receveuse synchronisée. La méthode est simple mais on ne peut obtenir que deux individus par clone.

La méthode utilisée à l'heure actuelle est le transfert nucléaire. Il s'agit d'extraire le matériel chromosomique d'un ovocyte ovulé en métaphase II et de le remplacer par le noyau d'une cellule donneuse. Le nombre d'individus par clone dépend alors du nombre de cellules donneuses et peut être très important dans le cas de cellules somatiques. Le principe de clonage par transfert nucléaire est assez bien rodé, et est commun à la plupart des équipes de recherche travaillant sur les clones. Les protocoles sont par contre spécifiques de chaque équipe, et diffèrent des autres par rapport aux milieux de culture utilisés et des cellules donneuses. Les individus clonés utilisés dans notre étude ont été obtenus par le protocole actuellement en usage à l'INRA (Chavatte-Palmer et al. 2002, Heyman et al. 2002).

a- Obtention des ovocytes

Les ovocytes proviennent d'ovaires collectés en abattoirs, rincés plusieurs fois avec une solution saline et acheminés dans un milieu PBS stérile et à 33°C au laboratoire dans les 3h post abattage. Puis les complexes ovocyte/cumulus des follicules de 2 à 7 mm sont aspirés, mesurés, calibrés, lavés puis choisis morphologiquement par rapport à la densité cellulaire de leur cumulus. Ensuite les complexes sont placés dans un milieu de maturation : un milieu *culture tissulaire medium 199 (TCM 199)* supplémenté à 10% en sang foetal bovin, pendant 22h à 39°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂. Après la maturation, les ovocytes peuvent servir soit à la fécondation in vitro, soit, dans notre cas, à recevoir le noyau d'une cellule somatique afin de produire un individu cloné.

b- Obtention des embryons

b-1. Le transfert nucléaire (NT)

Les ovocytes matures en métaphase IIs sont débarrassés mécaniquement des cellules du cumulus. Ils sont ensuite mis en culture en présence de hyaluronidase pendant 10 minutes (TCM 199 + 0.5% (w/v) hyaluronidase) afin de digérer la zone pellucide, puis en présence d'un colorant vital fluorescent (TCM 199 + 0.5µg/ml de Hoechst 33342) pendant 20 minutes. Ce procédé permet de visualiser la plaque métaphasique sous une lumière de faible intensité. A l'aide d'une pipette biseautée introduite sous la membrane pellucide, on extrait le premier globule polaire puis le matériel nucléaire en métaphase après avoir traversé la membrane cytoplasmique. Les ovocytes « vides » sont alors prêts à recevoir un autre matériel nucléaire.

Les cellules donneuses sont dans notre cas deux lignées de cellules somatiques adultes issues de cultures de fibroblastes. Les cellules sont mises en culture afin d'obtenir des populations quiescentes ou des populations en croissance. Quelques minutes avant le transfert les cellules sont séparées les unes des autres mécaniquement par centrifugation pendant 5 min à 1200 x g et remises en suspension dans un nouveau milieu de culture TCM 199.

La reconstitution de l'embryon se fait par micromanipulation. On introduit chaque cellule somatique isolée dans l'espace périvitellin à l'aide d'une pipette biseautée. Puis on provoque la fusion de la membrane ovocytaire et de la membrane cytoplasmique de la cellule donneuse en soumettant l'embryon à un champ électrique entre deux électrodes. Environ une heure après la fusion est effective, et l'électrostimulation provoque également l'activation et la reprise du développement embryonnaire (Vignon et al. 1998)

b-2. Devenir *in vitro* des embryons

Les embryons reconstitués issus de NT sont mis en culture dans 50 µl de milieu B avec 2.5% de sang de veau fœtal et en présence de cellules *Vero* (lignée cellulaire issue du rein d'un singe africain *Cercopithecus aethiops*, communément utilisée comme milieu de culture). Les micro-puits de culture sont ensuite fermés avec une huile minérale et mis à incuber pendant 7 jours à 39°C sous une atmosphère à 5% de CO₂. Après 2 jours de culture les embryons présumés sont examinés afin de vérifier la formation de blastocystes. Après 7 jours de culture les embryons sont évalués par comptage du nombre de cellules par blastocyste et seuls ceux de grade 1 et 2 seront implantés dans des génisses receveuses.

c- Préparation des receveuses

Les receveuses sont des génisses de race Normande (pour les veaux 2256 et 2262), Maine Anjou (pour le veau 309) ou croisées (pour les veaux 2258 et 2259), nées et élevées en fermes. Nous choisissons d'utiliser des génisses parce qu'elles ont un meilleur taux de réussite en transfert embryonnaire. Elles sont introduites à l'âge de 12 à 14 mois à la ferme expérimentale de Bressonvilliers après avoir subi différents tests (cutané, virologique et sérologiques), 2 mois de quarantaine et une vaccination contre *Mannheimia haemolytica* (Tecvax®) afin de garantir leur statut indemne des maladies infectieuses suivantes : brucellose, leucose, tuberculose, IBR, fièvre Q, Herpesvirus bovin 4, chlamydie, néosporose et BVD. Après quelques semaines d'acclimatation à leur nouvel environnement et après avoir vérifié que les génisses sont bien cyclées, elles sont synchronisées à l'âge de 15 à 18 mois à l'aide d'un protocole Crestar® (pose d'un implant de progestagènes, injection de prostaglandines à 9 jours et retrait à 11 jours). On détecte les génisses en chaleurs, et celles qui sont synchronisées à 24h près avec l'âge de l'embryon et qui ont un corps jaune, seront receveuses. Après 7 jours de culture, les blastocystes sont transférés à raison d'un par receveuse ; l'embryon est introduit de manière non chirurgicale, au moyen d'une seringue munie d'une canule, dans la corne ipsilatérale du corps jaune détecté. L'opération se fait sous anesthésie épidurale basse afin d'éviter toute douleur.

d- Suivi des gestations

Les génisses receveuses ont été suivies tout au long de la gestation.

d-1. Suivi biochimique

Un dosage de la progestérone plasmatique a été réalisé 21 jours après l'ovulation, soit 14 jours après l'implantation, afin de s'assurer qu'elles étaient bien gestantes, que les transferts s'étaient bien passés et que les embryons s'étaient bien implantés. Les génisses sont considérées comme non gestantes si leur taux de progestérone est inférieur à 1 mg/ml et supposées gestantes si le taux est supérieur à 2 mg/ml.

d-2. Suivi échographique

Toutes les génisses sont échographiées à 35 jours de gestation présumée afin de confirmer ou d'infirmer la présence d'un embryon viable. Il s'agit d'un examen par voie transrectale avec une sonde de 5 MHz. Les échographies sont répétées à 50, 70 et 90 jours de gestation. Un suivi échographique est effectué ensuite par voie rectale et transabdominale pour détecter et interrompre les gestations pathologiques (anomalies placentaires, hydropisie des enveloppes) et les anomalies de développement fréquents chez les clones (Chavatte-palmer et al, 2006 et Constant et al. 2006).

e- Naissance

La naissance des animaux clonés s'est faite par césarienne 36 heures après une injection de dexaméthasone lorsque le vêlage n'était pas intervenu après 282 jours de gestation. Les premiers examens interviennent dans les heures qui suivent la naissance : les veaux sont pesés, examinés et une prise de sang est réalisée avant la prise du colostrum.

f- Obtention des individus témoins

Les animaux témoins de notre étude sont des génisses Prim'holstein contemporaines des veaux clonés et nées après insémination artificielle. Le but de notre étude étant de déterminer si les animaux clonés sont des animaux normaux il nous a semblé plus judicieux d'utiliser comme témoins des individus nés dans des conditions les plus proches des conditions de terrain. Seules les femelles entrent dans le protocole afin d'éliminer le biais dû au sexe et toutes les génisses, clonées ou témoins, sont élevées de la même manière.

2- Examens des animaux

Notre étude porte sur 5 veaux clonés issus de deux génotypes différents, et 11 veaux témoins issus d'insémination artificielle. Le Tableau 2 montre les âges d'examens de ces animaux.

Tableau 2 : Echantillons prélevés et analysés (cases grisées) selon les animaux.

individus	J1	J4	J7	J14	J21	J35	J49	J70	J120	J180	J240	J300	J360	J420	J480	J540
Clones																
2256																
2258																
2259																
2262																
309																
Témoins																
301																
302																
303																
304																
305																
307																
308																
312																
2261																
2264																
2265																

Les animaux ont été examinés à intervalles réguliers au cours de leur période néonatale et de la croissance jusqu'à l'âge de 36 mois. Les prélèvements analysés portent d'une part sur la période néonatale (0 à 70 jours) et d'autre part sur la période de croissance de 4 à 18 mois d'âge.

a- Examens lors de la période néonatale

Les animaux sont élevés de la naissance à l'âge de 2 mois en case individuelle puis en groupe avec des génisses du même âge. La température rectale des génisses est prise matin et soir pendant les deux premiers mois et demi. Des examens cliniques et des prélèvements de sang et d'urine sont pratiqués tous les 3 jours durant la première semaine de vie (J1, J4, J7), puis une fois par semaine jusqu'à l'âge de 1 mois (J4 J21, J35) puis tous les 15 jours jusqu'à l'âge de 2 mois (J49 et J70). L'examen clinique est réalisé par le personnel de la station expérimentale INRA de Bressonvilliers et se décompose comme suit :

- fréquence cardiaque mesurée à l'aide d'un stéthoscope à trois reprises à 10 minutes d'intervalles ; on considère la moyenne des trois valeurs,

- fréquence respiratoire mesurée à l'aide d'un stéthoscope à trois reprises à 10 minutes d'intervalles ; on considère la moyenne des trois valeurs,
- examen locomoteur : on observe la démarche des animaux et l'absence d'ataxie,
- examen des muqueuses oculaire, gingivale et vulvaire,
- examen dermatologique : on relève les lésions cutanées observées.

Les prises de sang sont faites au niveau de la veine jugulaire, sur tubes secs et héparinés pour les analyses biochimiques, et sur EDTA pour les analyses hématologiques. Les tubes de sang sont centrifugés et le plasma ou sérum est congelé à -18°C sous forme d'aliqots. Le recueil d'urine se fait lors de miction spontanée après stimulation tactile au niveau de la vulve. On y ajoute de l'acide chlorhydrique (HCl) à 6 mol/L à raison de 1% du volume d'urine avant congélation à -18°C pour stockage.

b- Examens lors de la période de croissance

Lorsque les génisses passent de case individuelle en cases collectives de 6 à 8 animaux les examens cliniques sont faits moins souvent. Ils ont lieu tous les deux mois jusqu'à l'âge de 18 mois (période de croissance) puis tous les 6 mois jusqu'à l'âge de 36 mois (âge auquel une génisse Prim'holstein normale entre dans le cycle de production). L'examen clinique se déroule de la même façon et les prélèvements sont les mêmes. Par contre il est pratiqué par des intervenants extérieurs à Bressonvilliers à savoir un docteur vétérinaire (le Pr Mialot (ENVA), le Dr Chavatte-Palmer (INRA) ou le Dr Dominique Rémy (ENVA)) accompagné d'un ou plusieurs étudiants vétérinaires de l'ENVA. Les prélèvements de sang et d'urine sont faits par le personnel de Bressonvilliers le matin du jour de la visite.

Tous les examens sont faits en aveugle : les intervenants ne savent pas quelles génisses sont clonées et lesquelles sont des témoins.

B- Mesures effectuées sur les urines

Cette étude ayant pour objet l'évaluation du stress latent chez des génisses Prim'holstein, les premiers marqueurs du stress choisis sont les concentrations urinaires de catécholamines (adrénaline et noradrénaline) et la concentration urinaire de cortisol. En effet l'intérêt des valeurs

urinaires est qu'elles sont des marqueurs d'un stress chronique, et qu'elles évitent les variations ponctuelles et circadiennes des valeurs hormonales (voir première partie).

1. Dosage préalable de la créatinine urinaire

a- Problématique du prélèvement ponctuel d'urine

La méthode de récolte des échantillons d'urines – à savoir la miction spontanée après stimulation – est atraumatique et minimise au maximum le stress dû à l'opération, mais elle présente l'inconvénient qu'on ne maîtrise pas la durée de l'intervalle entre la dernière miction et le prélèvement. Ainsi l'urine sera plus ou moins concentrée suivant l'individu et le moment de récolte. De fait une expression des concentrations hormonales en fonction d'une unité volumique (le mL par exemple) est biaisée par la dilution plus ou moins importante des urines suivant sa durée de stockage et la consommation d'eau de l'animal.

b- Utilisation de la créatininurie

La créatinine est un produit de dégradation de la créatine. La créatine est une molécule de stockage de l'énergie pour les cellules musculaires et sa quantité dans l'organisme n'est corrélée qu'à la quantité de masse musculaire. En perdant une molécule d'ATP et une molécule d'eau la créatine se transforme de manière irréversible en créatinine dont l'excrétion est principalement urinaire. La clairance de la créatinine endogène permet une assez bonne évaluation de la filtration glomérulaire (Ganong 1997 d'après Hay 1999) et sa sécrétion urinaire est continue au cours de la journée. Ainsi la créatininurie est un marqueur de la concentration urinaire et nous servira de référence pour exprimer les concentrations des différentes molécules recherchées.

c- Méthode de dosage de la créatinine

La créatinine est mesurée dans chacun de nos échantillons urinaires à l'aide d'un dosage colorimétrique quantitatif. Lorsque la créatinine est placée en présence d'acide picrique dans un milieu alcalin, elle donne une coloration jaune orangée. Puis on mesure par spectrophotométrie l'absorbance du mélange à 490 nm (kit de dosage Fisher Créatinine de Biolabo, référence A4269107, protocole en Annexe 1 et fiche technique en Annexe 2). La comparaison avec une solution de créatinine de concentration connue permet de déterminer la concentration de l'échantillon en créatinine. Les urines étant diluées au 5^{ème} avant dosage, il convient de multiplier la concentration par 5.

2. Le dosage des concentrations urinaires des catécholamines par HPLC

a- Choix de la technique de dosage

Les dosages urinaires des catécholamines ont été effectués dans le laboratoire de neurobiologie et stress, INSERM U 471-INRA du Dr Pierre Mormède à l'Université Bordeaux 2.

Le technique choisie a été mise au point, au préalable pour des études chez le porc, par M. Hay en 1999. Il s'agit d'un dosage par HPLC, ou chromatographie liquide à haute pression, couplée à une détection électrochimique. Cette technique permet le dosage simultané de toutes les catécholamines dont l'adrénaline et la noradrénaline qui nous intéressent. De plus la sensibilité de la détection électrochimique est excellente ce qui a permis d'adapter facilement le protocole issu de la biochimie humaine notamment parce que les concentrations urinaires de catécholamines libres chez les bovins sont plus faibles que chez l'homme.

b- Caractéristiques du dosage

Les coefficients intra- et inter-essai sont de 7,04% et 7,09% pour la noradrénaline, et de 6,51% et 11,60% pour l'adrénaline (Hay M. et Mormède P. 1997a). La limite moyenne de détection est de 0,04 ng dans les 60 µl de l'échantillon injecté dans l'analyseur. De plus l'efficacité d'extraction est d'environ 78% pour les catécholamines. Enfin les coefficients de corrélation linéaires sont de 0,999 et 0,999 pour l'adrénaline et la noradrénaline. L'HPLC est en outre reconnue pour son excellente spécificité.

c- Protocole du dosage

Protocole détaillé en Annexe 3.

c-1. Préparation des échantillons

Les urines sont d'abord centrifugées à 3500G pendant 15 min. Puis on prépare dans des béchers une prise d'essai de chaque échantillon, calculée en fonction de la concentration en créatinine de façon à atteindre le plafond de détection, à laquelle on ajoute une quantité connue de DHBA (3-4-dihydroxybenzylamine hydrobromide) qui est une molécule non excrétée par l'organisme, ici utilisée comme standard interne, et de l'EDTA à 3g/l afin d'ioniser le groupement catéchol. Le pH de chaque bécher est ajusté à une valeur comprise entre 6,45 et 6,55.

c-2. Extraction des catécholamines

L'extraction se fait en passant les urines préparées sur des colonnes cationiques (Bio-Rad, France d'après Hay et Mormède 1997). Ces colonnes ne retiennent que les molécules de pH 6,5. Les catécholamines se fixent sur les colonnes et celles ci sont rincées à l'eau distillée. Puis les catécholamines sont libérées de leurs colonnes par élution avec de l'acide borique (qui modifie le pH des molécules retenues).

c-3. Chromatographie

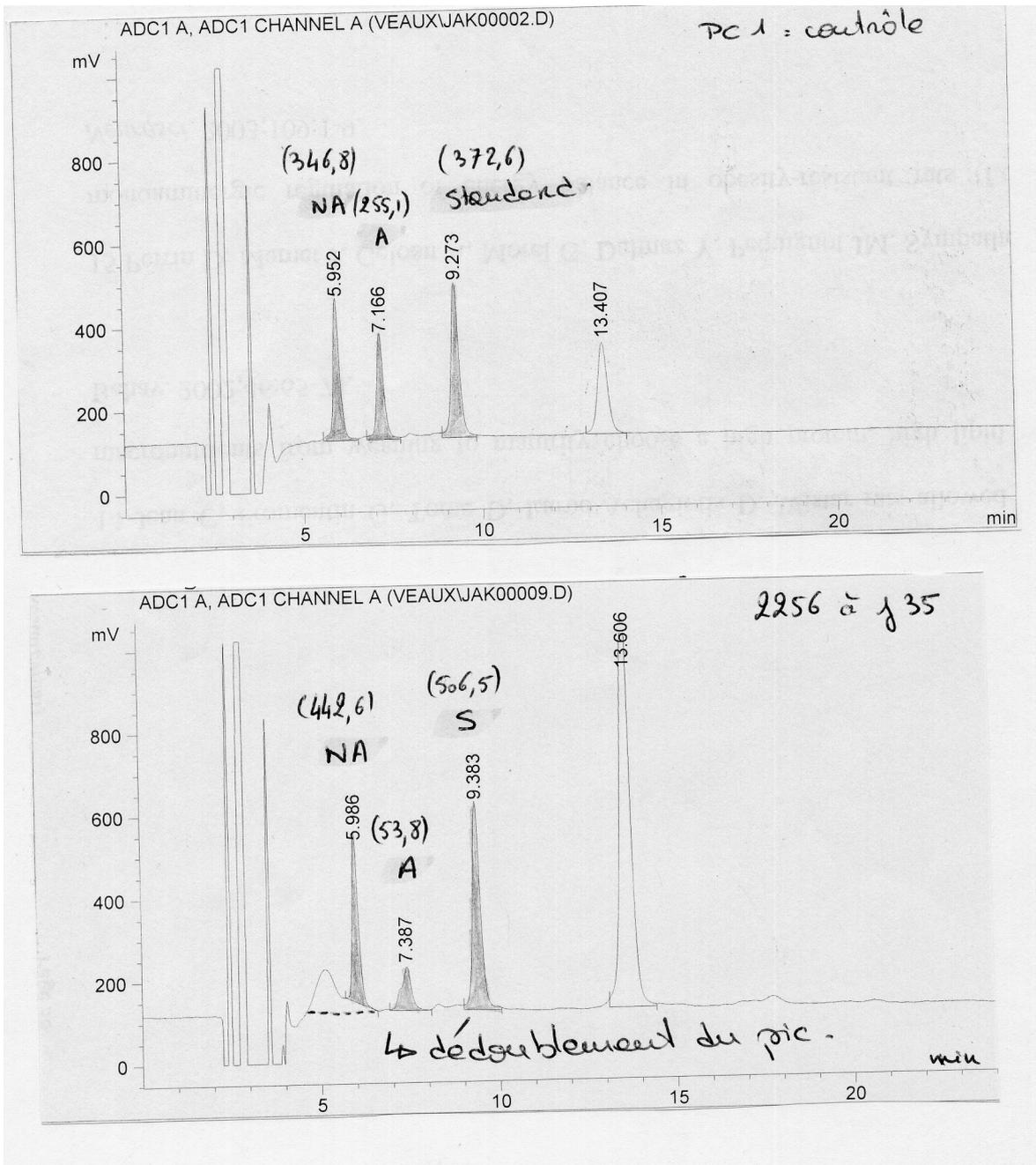
Les éluats sont dilués avec $\frac{3}{4}$ de phase mobile pour éviter un doublement des pics de détection. La phase mobile est composée de méthanol, d'eau, d'acétate de sodium et d'acide citrique, et elle est stabilisée à un pH de 3,8. Puis 60 μ l de la solution diluée sont injectés dans la chaîne HP 1100. La détection électrochimique se fait à +0,65 V.

c-4. Lecture du chromatogramme

Le chromatogramme est l'ensemble des pics détectés par électrochimie. Les catécholamines sont identifiées par leur temps de rétention dans la chaîne. Les pics des substances qui nous intéressent se situent aux alentours de 6 min pour la noradrénaline, de 7, 2 min pour l'adrénaline et de 9,5 min pour le standard interne. La quantité de chaque molécule est proportionnelle à l'aire sous sa courbe de détection. Ainsi nous évaluons la quantité chaque molécule par un ratio entre la hauteur du pic de la molécule et la hauteur du pic du standard interne. Cette méthode permet de prendre en compte l'efficacité d'extraction.

Un exemple de chromatogrammes est présenté sur la Figure 10.

Figure 10 : Chromatogrammes des catécholamines urinaires sur un échantillon contrôle et sur un échantillon veau.



3. Le dosage des glucocorticoïdes urinaires par HPLC

a- Choix de la technique de dosage

Les dosages ont également été faits au laboratoire de neurobiologie et stress, INSERM U 471-INRA du Dr Pierre Mormède à l'Université Bordeaux 2.

Le dosage d'hormones glucocorticoïdes pose un certain nombre de problèmes techniques : faibles concentrations d'hormones dans les urines, présence d'autres substances stéroïdes. L'outil de dosage choisi est le même que pour les catécholamines à savoir l'HPLC pour sa facilité d'emploi : pas de molécules radioactives, coût modéré et possibilité de doser le cortisol et ses dérivés (notamment la cortisone) en une seule fois. Par contre la méthode d'extraction est différente et met en jeu le caractère liposoluble des glucocorticoïdes. La détection des glucocorticoïdes dans la chaîne de chromatographie se fait par absorption UV (254 nm).

b- Caractéristiques du dosage

Les coefficients intra- et inter-essai sont de 7,4% et 10, 6% pour le cortisol (Hay et Mormède, 1997b). La limite de détection est de 1 ng dans les 100 µl injectés dans la chaîne (soit 1,5 ng de résidus secs remis en solution avec 150 µl de phase avant l'injection). L'efficacité moyenne de l'extraction du cortisol est de 83 (+/- 1,5) %. L'extraction et la détection sont linéaires pour le cortisol avec un coefficient de corrélation linéaire de 0,998.

c- Protocole du dosage

Protocole détaillé en Annexe 4.

c-1. Préparation des échantillons

Les urines sont d'abord centrifugées à 3500G pendant 15 min et filtrées sur des filtres ronds à usage unique à l'aide d'une seringue. On prélève une prise d'essai de chaque échantillon (d'un volume fonction de la concentration de l'échantillon en créatinine) à laquelle on ajoute une quantité connue de substance S de Reichstein (11-desoxy-17-hydroxycorticosterone) qui servira de standard interne, et que l'on complète avec de l'eau milliQ afin d'avoir un mélange de 8ml.

c-2. Extraction

Sous un vide de 0,2 bars les mélanges sont passés sur des colonnes en silice (cartouches Isolute, Monofunctional silane MFC18 200mg/10ml IST, Mid Glamorgan, UK) d'après Hay et Mormède (1997b), qui retiennent les substances lipophiles et laissent passer les substances hydrophiles. Les colonnes sont ensuite rincées avec de l'eau milliQ, puis successivement avec de l'acide chlorhydrique et de la soude afin d'ioniser les impuretés restantes : les glucocorticoïdes ne se ionisent pas et restent lipophiles quel que soit le pH. Puis les glucocorticoïdes sont élués avec de l'éthanol pour lequel ils ont plus d'affinité que pour la silice des colonnes et sont recueillis dans des tubes en verre. Ceux-ci sont ensuite mis dans l'évaporateur sous vide pendant au moins 4 heures entre 45 et 60°C. L'éthanol va s'évaporer pour laisser les résidus secs de glucocorticoïdes au fond des tubes.

c-3. Chromatographie

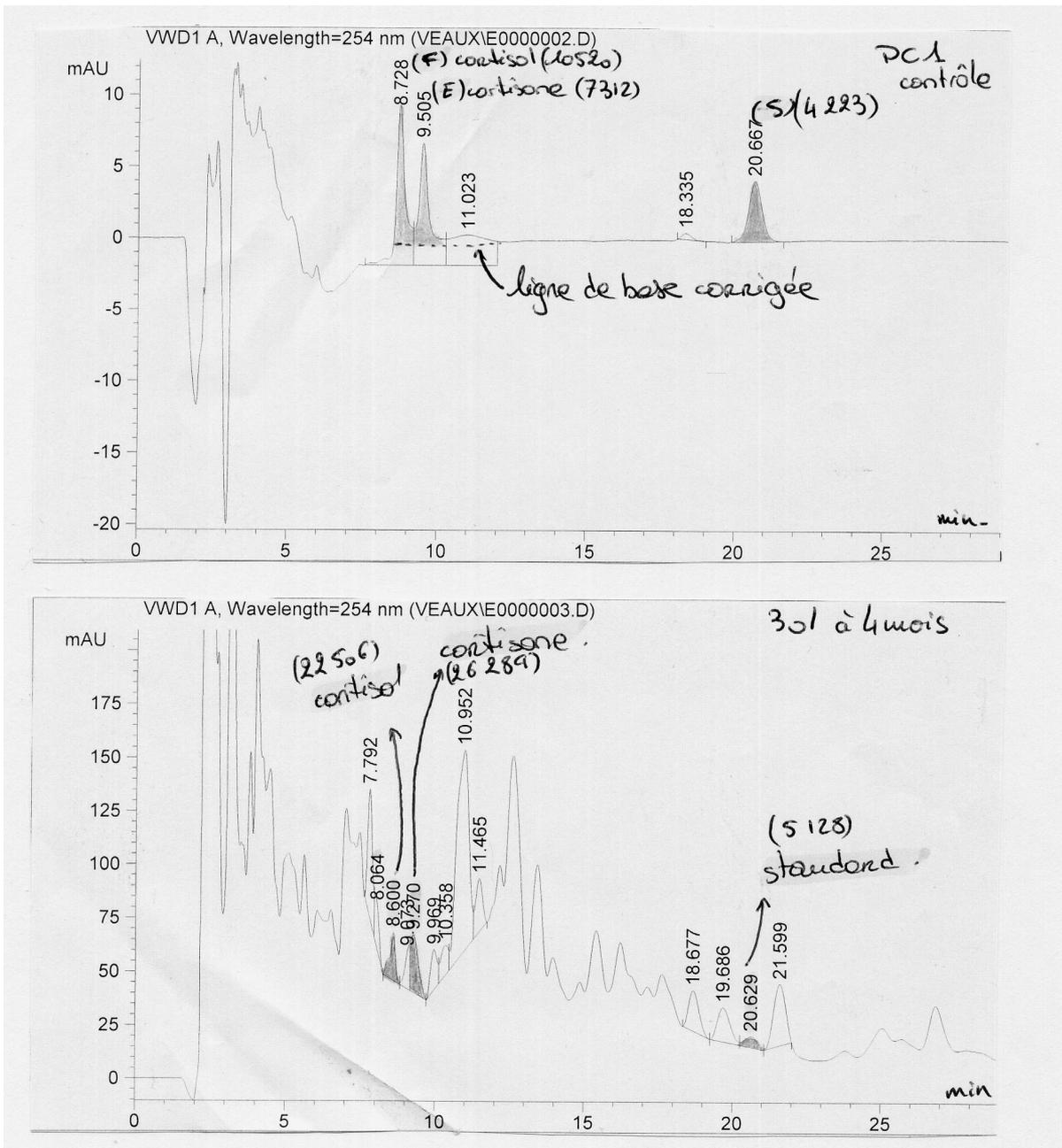
Les résidus secs de glucocorticoïdes sont repris avec 120 µl de la même phase mobile que pour les catécholamines, avant d'être injectés dans la chaîne HP 1100. La détection se fait par spectrophotométrie UV puisque les glucocorticoïdes absorbent à 254 nm.

c-4. Lecture du chromatogramme

Le chromatogramme est l'ensemble des pics détectés par absorption UV. Les glucocorticoïdes sont identifiés par leur temps de rétention dans la chaîne. Les pics des substances qui nous intéressent se situent aux alentours de 8,7 min pour le cortisol, de 9,5 min pour la cortisone et de 20,8 min pour le standard interne. La quantité de chaque molécule est proportionnelle à l'aire sous sa courbe de détection. Ainsi nous évaluons la quantité chaque molécule par un ratio entre la hauteur du pic de la molécule et la hauteur du pic du standard interne. Cette méthode permet de prendre en compte l'efficacité d'extraction.

Un exemple de chromatogrammes en Figure 11.

Figure 11 : Chromatogrammes des glucocorticoïdes urinaires sur un échantillon contrôle et sur un échantillon veau.



C- Mesures effectuées sur le sérum

Cette étude ayant pour objet l'évaluation du stress latent chez des génisses Prim'holstein, le marqueur du stress choisi, outre des marqueurs urinaires, est la concentration plasmatique de cortisol. De plus nous avons voulu mesurer les concentrations plasmatiques d'hormones thyroïdiennes T3 (triiodothyronine) libre et T4 (thyroxine) libre qui sont le principal facteur influençant la température interne d'un organisme sain afin de relier éventuellement les hyperthermies constatées à une anomalie de fonctionnement de l'axe thyroïdien ou un plus grande sensibilité au stress.

1. Dosage du cortisol plasmatique chez les animaux entre 1 et 70 jours

a- Choix de la technique de dosage

Nous avons utilisé un analyseur Elecsys 1010® (Roche) avec un kit de dosage Cortisol du même laboratoire : Cortisol (11875116 Roche®). Il s'agit d'un test d'électro-chimi-luminescence mettant en jeu le principe de la compétition. L'un des réactifs contient également du Danazol, une molécule qui libère le cortisol endogène de ses protéines de liaison. Le principe de dosage est le suivant.

- Une prise d'essai de 20 µl de sérum ou plasma est incubée avec un anticorps polyclonal (de mouton) anti-cortisol spécifique, marqué à la biotine, et un dérivé du cortisol, marqué avec du ruthénium. Les sites de liaisons libres de l'anticorps sont occupés en partie par du cortisol endogène et en partie par l'haptène marqué. Il se forme des immunocomplexes anti-cortisol en relation avec la concentration de cortisol endogène.

- Des microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutées dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immunologique se fixe alors à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine.

- Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de Procell. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.

- Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Une courbe de référence est mémorisée dans le code barres du réactif et est réajustée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en deux points.

b- Caractéristiques du dosage

Les précisions intra- et inter-essai fournies dans la fiche technique sont données pour deux solutions contrôles : respectivement 2,6% et 5,6% pour PCU1 (de valeur 386 nmol/l) et 2,1% et 5,4% pour PCU2 (de valeur 921 nmol/l). Ces deux contrôles sont ceux recommandés par le laboratoire pour l'analyseur utilisé. Le domaine de mesure se situe entre 1,00 et 1750 nmol/l. La limite de détection, ou sensibilité analytique, est de 1 nmol/l ; elle représente la concentration la plus faible de la courbe de référence pouvant être différenciée de 0. La sensibilité fonctionnelle, ici égale à 8 nmol/l est la plus faible concentration que l'on peut détecter avec précision, c'est à dire avec un coefficient de variation inférieur à 20%.

2. Dosage du cortisol plasmatique chez les animaux entre 4 et 18 mois

Choix de la technique de dosage

Ce dosage a été réalisé dans le laboratoire du Dr P Mormède c'est pourquoi il ne s'agit pas de la même technique que pour les animaux en bas âge. Il s'agit d'un dosage radio-immunologique par compétition qui utilise un anticorps du laboratoire, l'anticorps Cortisol Charles 917. Les échantillons sont mis en présence d'une quantité connue de cortisol radioactif puis d'une quantité connue d'anticorps. La lecture se fait par mesure de la radioactivité après ajout d'un liquide de scintillation, et transcription sur des abaques qui la corrélient à des valeurs de cortisolémie. Les abaques sont préalablement établis à l'aide d'une gamme de plasma porcin dont la cortisolémie est connue. Il s'agit de la méthode utilisée en routine dans ce laboratoire.

3. Dosage de la triiodothyronine (T3) plasmatique libre

a- Choix de la technique de dosage

Nous avons utilisé un analyseur Elecsys 1010® (Roche) avec un kit de dosage FT3 du même laboratoire : FT3-triiodothyronine libre (03051986 Roche®). Il s'agit d'un test d'électrochimie-luminescence mettant en jeu le principe de la compétition. Le principe de dosage est le suivant.

- Une prise d'essai de 15 µl est mise en présence d'un anticorps polyclonal (de mouton) anti-T3 marqué au ruthénium.

- Puis de la T3 marquée à la biotine et des microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutées. L'excès d'anticorps marqué au ruthénium capte la T3 marquée à la biotine. Il se forme un complexe haptène-anticorps. Puis le complexe est fixé à la phase solide par une liaison biotine-streptavidine.

- Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de Procell. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.

- Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Une courbe de référence est mémorisée dans le code barres du réactif et est réajustée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en deux points.

b- Caractéristiques du dosage

Les précisions intra- et inter-essai fournies dans la fiche technique sont données pour deux solutions contrôles : respectivement 1,7% et 2,2% pour PCU1 (de valeur 4,98 pmol/l) et 1,5% et 1,7% pour PCU2 (de valeur 22,0 pmol/l). Ces deux contrôles sont ceux recommandés par le laboratoire pour l'analyseur utilisé. Le domaine de mesure se situe entre 0,400 à 50,00 pmol/l. La limite de détection, ou sensibilité analytique, est de 0,400 pmol/l ; elle représente la concentration la plus faible de la courbe de référence pouvant être différenciée de 0.

4. Dosage de la thyroxine (T4) plasmatique libre

a- Choix de la technique de dosage

Nous avons utilisé un analyseur Elecsys 1010® (Roche) avec un kit de dosage FT4 du même laboratoire : Thyroxine libre (11731297 Roche®). Il s'agit d'un test d'électro-chimiluminescence mettant en jeu le principe de la compétition. Le principe de dosage est le suivant.

- Une prise d'essai de 15 µl est mise en présence d'un anticorps anti-T4 marqué au ruthénium.

- Puis de la T4 marquée à la biotine et des microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutées. L'excès d'anticorps marqué au ruthénium capte la T4 marquée à la biotine. Il se forme un complexe haptène-anticorps. Le complexe est fixé à la phase solide par une liaison biotine-streptavidine.

- Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de Procell. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.

- Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Une courbe de référence est mémorisée dans le code barres du réactif et est réajustée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en deux points.

b- Caractéristiques du dosage

Les précisions intra- et inter-essai fournies dans la fiche technique sont données pour deux solutions contrôles : respectivement 1,8% et 2,7% pour PCU1 (de valeur 17,5 pmol/l) et 1,8% et 3,0% pour PCU2 (de valeur 26,1 pmol/l). Ces deux contrôles sont ceux recommandés par le laboratoire pour l'analyseur utilisé. Le domaine de mesure se situe entre 0,300 à 100,0 pmol/l. La limite de détection, ou sensibilité analytique, est de 0,30 pmol/l ; elle représente la concentration la plus faible de la courbe de référence pouvant être différenciée de 0.

D- Outils statistiques

1. Utilisations des données brutes

Les données brutes ont servi à établir des moyennes par âges et par type d'animaux : clones ou témoins. Ces moyennes seront figurées dans des tableaux dans la partie Résultats. L'exploitation initiale de ces données s'est faite par des courbes, en général sans droite de régression linéaire (sauf pour le paramètre température rectale). Les barres d'erreurs ont été ajoutées à chaque point ; Elles ont pour valeur le SEM défini tel qu'étant l'écart-type des valeurs – SD - divisé par la racine du nombre de ces valeurs – NB (SD / \sqrt{NB}). Utiliser le SEM a pour intérêt de permettre la comparaison des écart-types de séries d'ayant pas le même nombre de mesures.

2. Utilisations statistiques des données

Pour être utilisées par l'outil statistique les données des catécholamines ont été transformées par la fonction « logarithme décimal » ou Log du fait de la grande variabilité individuelle. Pour tous les paramètres mesurés, une analyse de la variance ANOVA a été effectuée en utilisant la procédure mixte du logiciel statistique SAS, avec groupe, individu et âge utilisés comme variables. Les effets du groupe, de l'âge et l'interaction groupe par âge ont été testés globalement sur chaque ensemble de données (données obtenues chez les adultes et données obtenues chez les jeunes traitées séparément). Une valeur P inférieure à 0,05 a été utilisée comme valeur seuil pour une différence statistiquement significative.

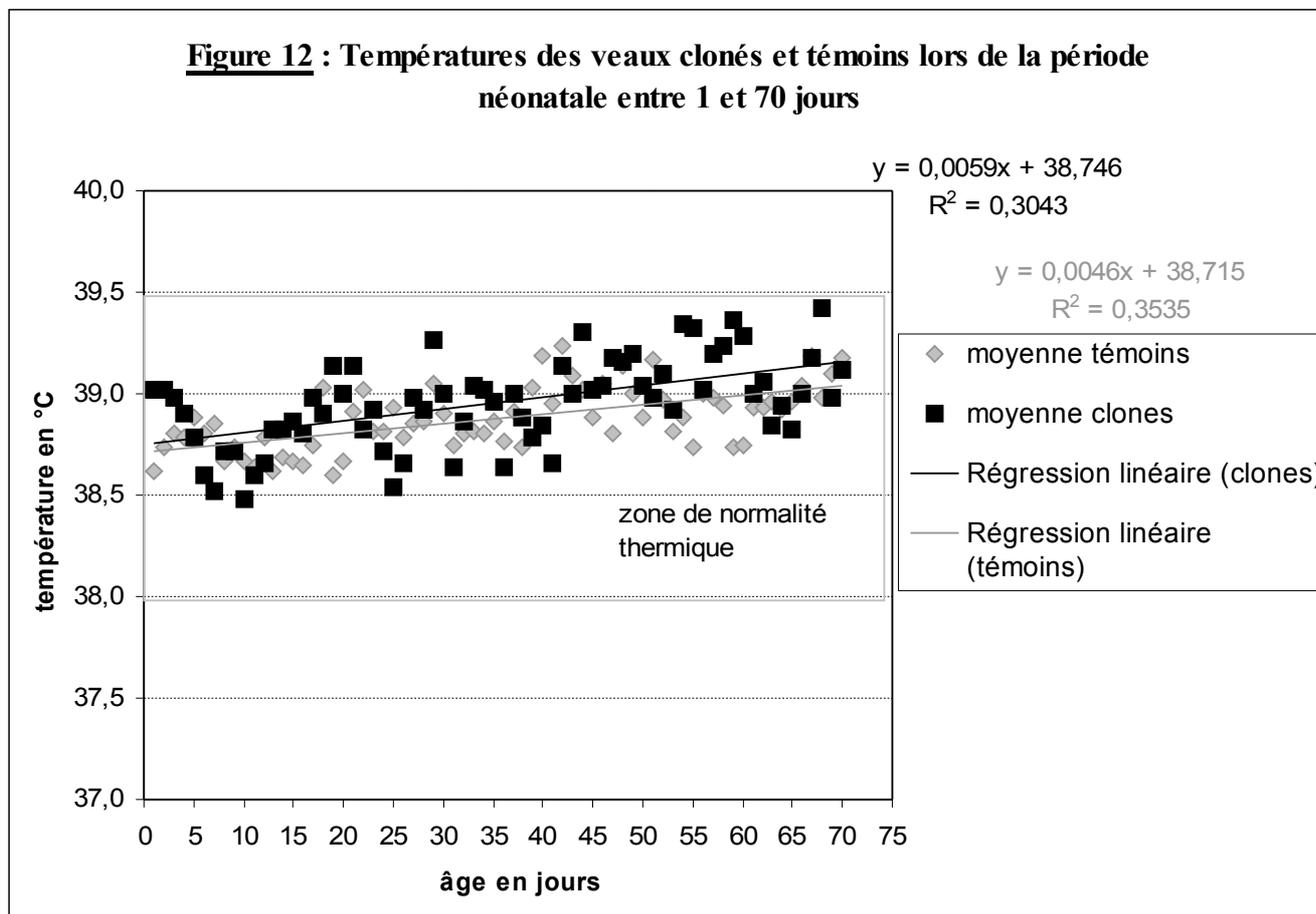
II. Résultats

A- Températures rectales

1. Veaux de 1 à 70 jours

La Figure 12 montre les températures rectales moyennes des veaux clonés et des veaux témoins le matin au réveil pendant la période néonatale (de 1 à 70 jours). Les températures des veaux, qu'ils soient clonés ou témoins, restent dans les normes de l'espèce entre 38 et 39,5°C. Les

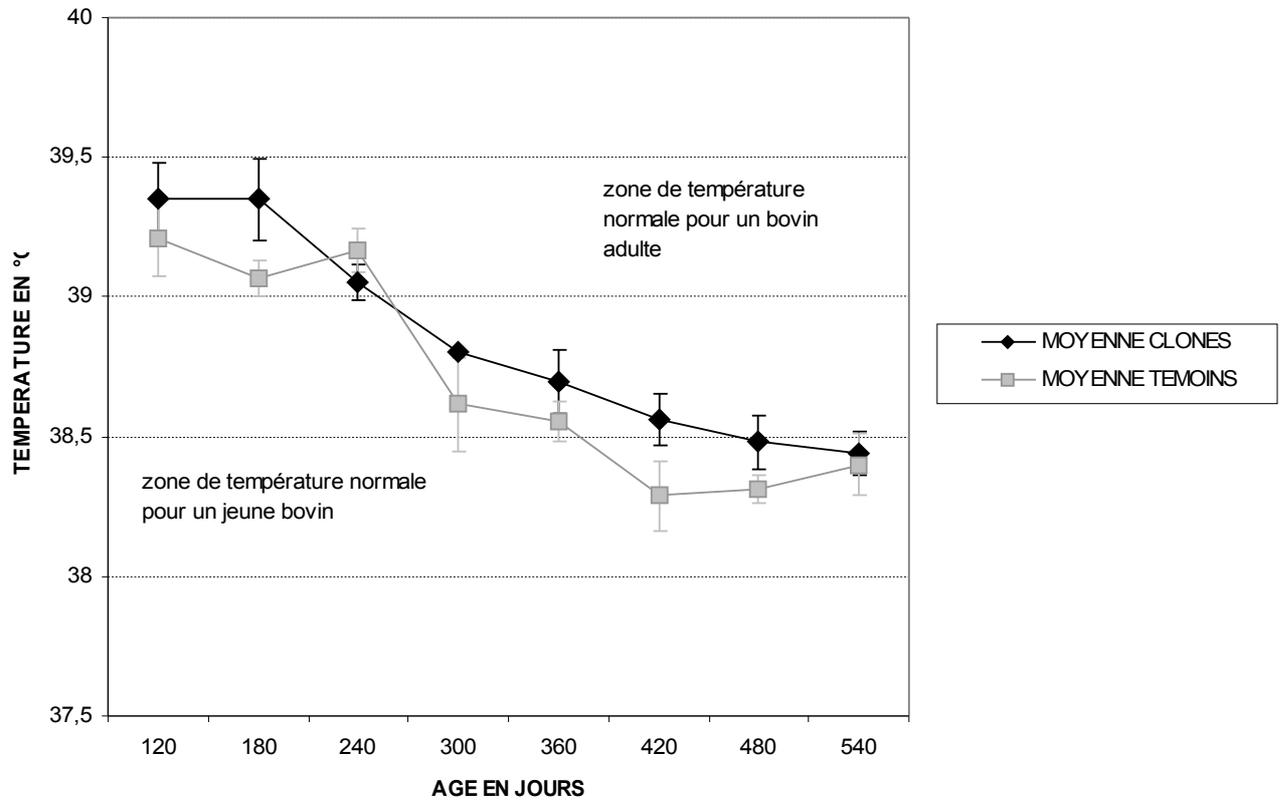
droites de régression linéaire sont légèrement croissantes de façon quasi parallèle, celle des clones étant toutefois 0,1°C au dessus de celle des témoins. On remarquera que les valeurs extrêmes sont le plus souvent celles des animaux clonés. On voit également une plus forte variabilité de la température interne chez les veaux clonés que chez les veaux témoins.



2. Veaux de 120 à 540 jours

La Figure 13 montre les températures rectales moyennes des veaux clonés et des veaux témoins le matin au réveil pendant la période de croissance entre 120 et 540 jours soit 4 à 18 mois. On observe une tendance des températures moyennes à diminuer avec l'âge ce qui est un phénomène normal chez tous les mammifères. A partir de 12 mois les températures rectales moyennes se stabilisent autour de 38,5 qui est la température normale d'une vache adulte. On ne voit pas de différence entre les veaux clonés et les veaux témoins.

Figure 13 : Températures des veaux clonés et témoins lors de la période de croissance entre 120 et 540 jours



B- Dosages urinaires

1. Catécholamines

a- Veaux entre 1 et 70 jours

Les résultats des dosages des urines des veaux en bas âge sont visibles dans les Tableaux 3 et 4 et la Figure 14 pour la noradrénaline et 15 pour l'adrénaline.

Tableau 3 : Valeurs urinaires moyennes d'adrénaline (A) et de noradrénaline (NA) chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours.

Age en jours	NA en ng/mg de créatinine		A en ng/mg de créatinine	
	clones	témoins	clones	témoins
1	52,105	24,670	5,696	3,257
4	44,150	13,420	3,177	2,459
7	78,770	22,693	7,956	3,372
9	22,756	14,058	3,900	2,350
14	17,849	13,773	2,050	1,976
21	33,875	17,892	4,829	3,238
35	19,812	12,872	3,350	2,105
49	32,362	17,672	7,285	2,350
70	19,066	14,566	4,121	1,823

Tableau 4 : SEM des mesures urinaires d'adrénaline (A) et de noradrénaline (NA) chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours.

Age en jours	NA		A	
	clones	témoins	clones	témoins
1	8,958	8,487	1,213	1,180
4	7,621	15,800	0,468	2,610
7	6,671	4,344	0,227	0,489
14	1,717	3,800	0,192	0,683
21	4,319	3,366	0,655	0,788
35	2,700	1,456	0,485	0,411
49	8,239	2,882	2,581	0,351
70	3,524	2,575	0,887	0,337

Figure 14 : Concentrations moyennes de noradrénaline (ng/mg de créatinine) +/- SEM, dans les urines des veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours

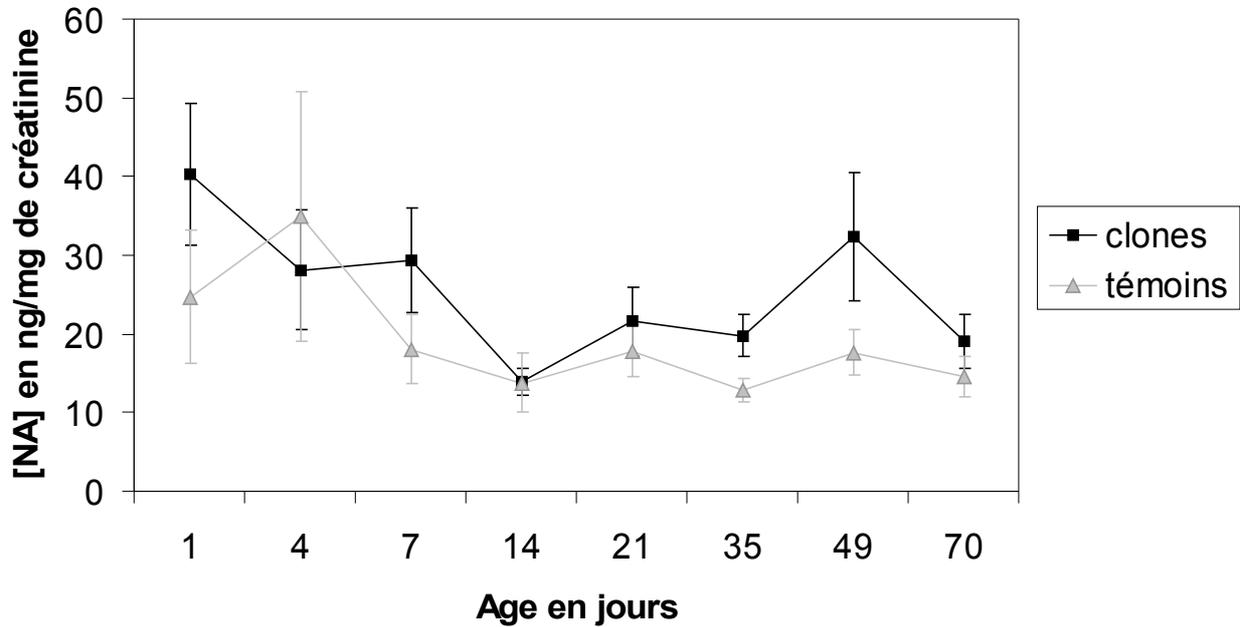
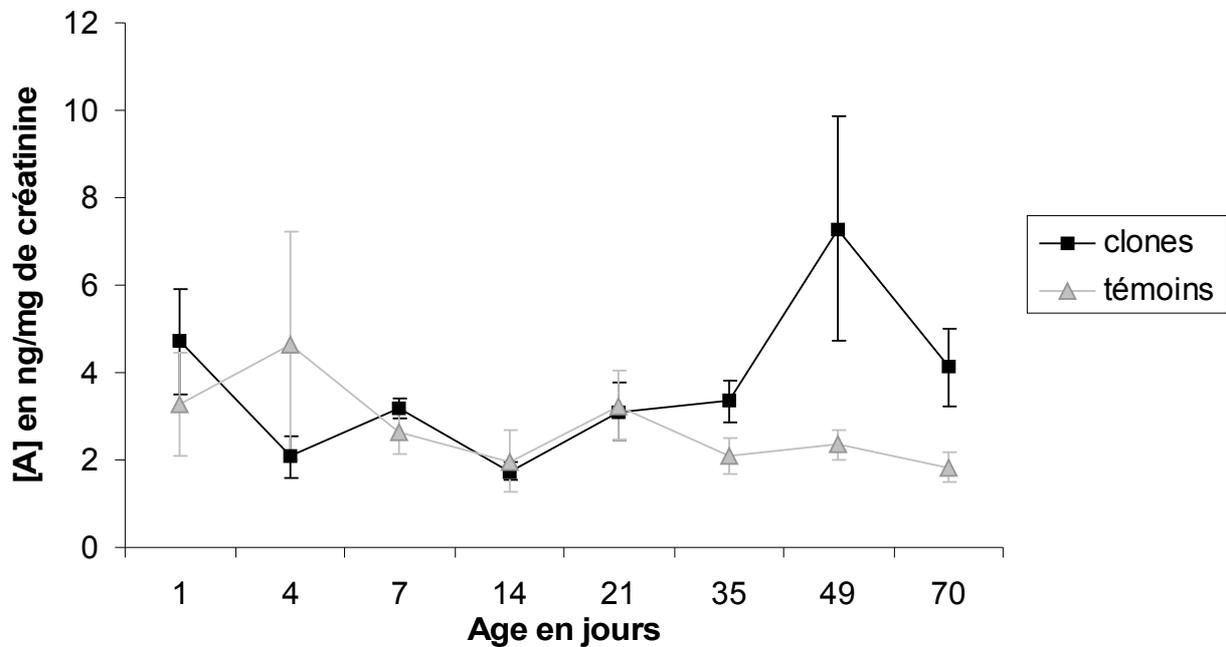


Figure 15 : Concentrations moyennes d'adrénaline (ng/mg de créatinine) +/- SEM dans les urines des veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours



On observe des valeurs moyennes de noradrénaline urinaire qui restent globalement autour de 25-30 ng/mg de créatinine au cours des 2 premiers après la naissance. On note des variations au

cours du temps et une dispersion des valeurs (visualisées par la taille de la barre d'erreur) plus marquées chez les veaux clonés que chez les veaux témoins. Il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les veaux clonés et les veaux témoins.

La courbe concernant l'adrénaline donne à peu de choses près les mêmes impressions. On notera cependant que les valeurs moyennes d'adrénaline urinaires sont particulièrement stables chez les veaux témoins autour de 2-3 ng/mg de créatinine. Les valeurs des veaux clonés s'organisent plutôt autour de 4 ng/mg de créatinine mais de façon beaucoup plus variables avec un pic à 7,3 à J49. Il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les veaux clonés et les veaux témoins.

b- Veaux entre 4 et 18 mois

Les résultats des dosages des urines des veaux lors de la période de croissance entre 4 et 18 mois, sont visibles dans les Tableaux 5 et 6 et la Figure 16 pour la noradrénaline et 17 pour l'adrénaline.

Tableau 5 : Valeurs urinaires moyennes d'adrénaline (A) et de noradrénaline (NA) chez les veaux clonés et témoins entre 4 et 18 mois.

Age en jours	NA		A	
	clones	témoins	clones	témoins
120	38,407	23,805	4,859	8,449
180	21,980	24,134	5,743	5,751
240	12,383	22,686	4,375	4,692
300	21,202	19,837	5,738	5,464
360	17,604	18,726	7,656	5,312
420	26,177	19,879	5,616	3,950
480	22,688	19,186	4,498	4,344
540	14,087	18,857	2,872	3,930

Tableau 6 : SEM des mesures urinaires d'adrénaline (A) et de noradrénaline (NA) chez les veaux clonés et témoins entre 4 et 18 mois.

Age en jours	NA		A	
	clones	témoins	clones	témoins
120	5,016	1,858	1,302	1,754
180	3,827	2,541	1,105	0,638
240	2,159	3,128	0,595	0,648
300	3,130	1,738	1,077	0,684
360	2,888	2,706	0,997	0,785
420	2,903	2,807	0,852	0,651
480	3,999	2,305	0,881	0,899
540	0,927	2,898	0,512	0,483

Figure 16 : Concentrations moyennes de noradrénaline (ng/mg de créatinine) +/- SEM dans les urines des veaux clonés et témoins entre 4 et 18 mois.

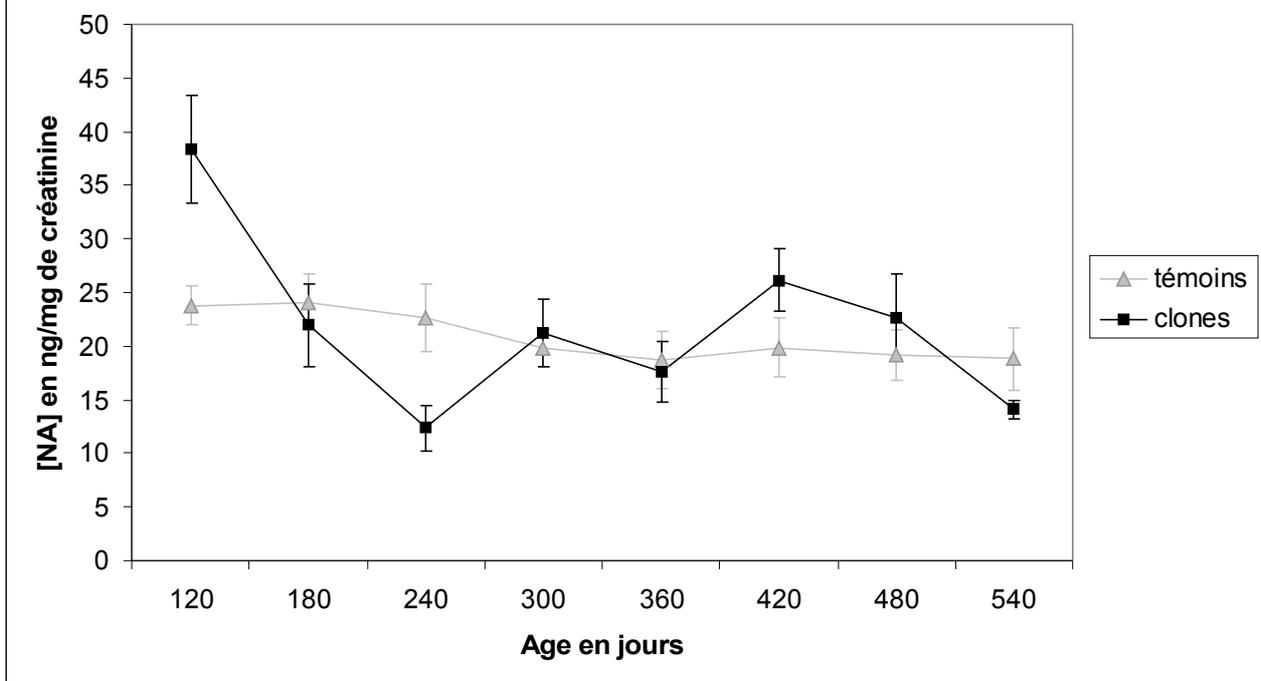
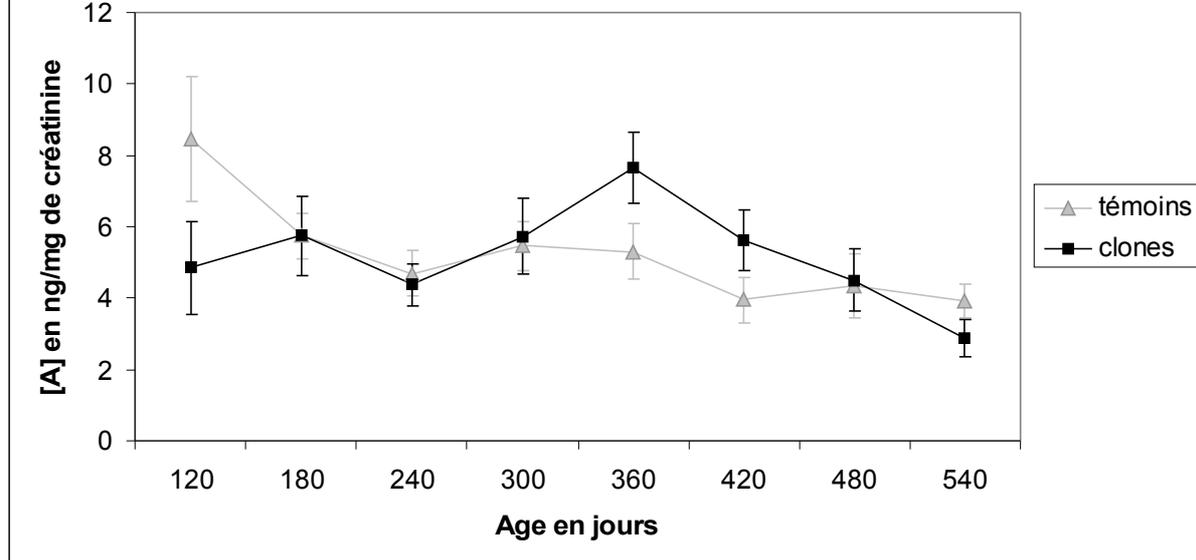


Figure 17 : Concentrations moyennes de l'adrénaline (ng/mg de créatinine) +/-SEM, dans les urines des veaux clonés et témoins entre 4 et 18 mois.



L'impression qui se dégage des courbes d'adrénaline et de noradrénaline urinaires chez les veaux après 4 mois est la même que pour les animaux en bas âge. Les valeurs moyennes de noradrénaline sont assez stables au cours du temps chez les veaux témoins et chez les veaux clonés autour de 20-25 ng/mg de créatinine soit des valeurs proches des celles des veaux en bas âge. Les valeurs moyennes d'adrénaline sont assez stables au cours du temps chez les veaux témoins et chez les veaux clonés autour de 5-6 ng/mg de créatinine. Il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les veaux clonés et les veaux témoins.

2. Glucocorticoïdes

Les dosages des glucocorticoïdes urinaires ont été réalisés en parallèle de ceux des catécholamines. Les résultats obtenus ont posé un problème de lecture. En effet les taux de glucocorticoïdes urinaires sont très faibles chez les bovins et nous nous sommes heurtés à un problème de détection. La méthode d'extraction est assez peu spécifique des glucocorticoïdes puisque toutes les molécules lipophiles sont électriquement neutres. Ainsi de nombreuses molécules assez proches chimiquement des glucocorticoïdes sont retenues dans les colonnes d'extraction et passent ensuite dans la colonne de l'HPLC créant un très important bruit de fond dont on a du mal à dégager les pics des molécules qui nous intéressent le cortisol et le standard interne. L'annexe 8 donne un exemple du bruit de fond que l'on peut mettre en évidence. Les pics se superposent et on arrive difficilement, voire pas du tout, à distinguer le pic de cortisol au temps de rétention prévu.

De plus dans les cas où on y parvient, c'est la ligne de base qu'on n'arrive pas à déterminer ce qui biaise de façon assez importante la hauteur des pics. Nous avons réalisé les premiers dosages de glucocorticoïdes et lorsque que les premières valeurs ont été analysées nous nous sommes rendus compte que les valeurs du standard interne et des pool d'urines utilisés pour le calcul des coefficients intra- et inter-essai étaient beaucoup trop différentes les unes des autres alors qu'elles sont sensées être constantes. Nous avons décidé de ne pas présenter les résultats de ces mesures en raison de leur manque de fiabilité et de précision. Nous discuterons ce choix dans la partie suivante de notre travail.

L'annexe 5 montre des exemples d'anomalies dans les chromatogrammes obtenus : bruit de fond, absence de pic, ligne de base indéfinissable, superposition de nombreux pics.

C- Dosages plasmatiques

1. Cortisol

a- Veaux de 1 à 70 jours

Les résultats obtenus pour le cortisol plasmatique chez les clones entre 1 et 70 jours sont visibles dans les Tableaux 7 et 8 et sur la Figure 18.

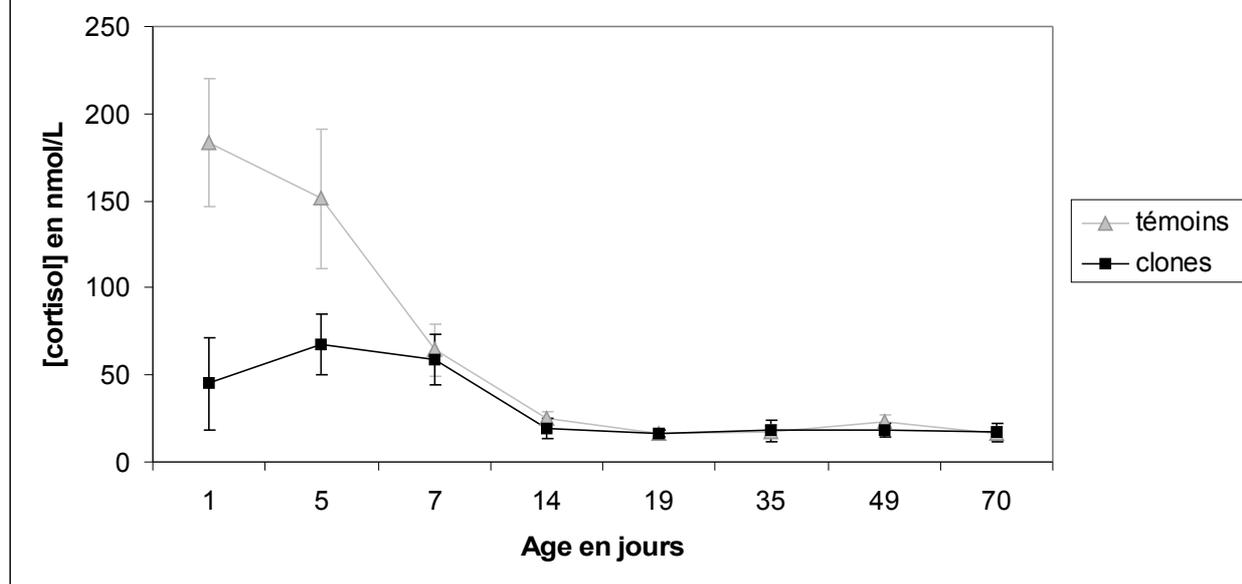
Tableau 7 : Moyennes des mesures du cortisol plasmatique (en nmol/l) chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours.

Age en jours	cortisol	
	clones	témoins
1	45,292	183,533
5	67,708	151,253
7	59,02	64,543
14	19,36	25,088
19	16,044	16,723
35	17,998	17,765
49	18,402	23,415
70	16,99	16,108

Tableau 8 : SEM des valeurs du cortisol plasmatique (en nmol/l) chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours.

Age en jours	cortisol	
	clones	témoins
1	26,577	36,518
5	17,610	39,773
7	14,511	14,945
14	5,883	3,951
19	1,958	2,622
35	6,079	3,244
49	4,215	3,468
70	4,996	4,440

Figure 18 : Concentrations moyennes de cortisol plasmatique chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours



Les valeurs moyennes de cortisol plasmatique ne sont notablement différentes entre clones et témoins qu'au cours de la première semaine de vie. Les valeurs mesurées à J1 et J5 varient respectivement d'un facteur 4 et 2,3. A partir de J7, les cortisolémies moyennes des veaux clonés et des veaux témoins sont identiques et la dispersion des valeurs individuelles est minime. La cortisolémie est assez haute à la naissance chez les témoins et décroît rapidement au cours des 2 premières semaines pour atteindre une valeur stabilisée autour de 15-20 nmol/l à partir de J14. Chez les veaux issus de clonage la cortisolémie est assez basse à la naissance (45 nmol/l) et ne diminue que légèrement au cours de 2 premières semaines. Au delà de 15 jours d'âge, on observe une très faible variabilité individuelle, marquée par des SEM très petits, aussi bien chez les veaux clonés que chez les veaux témoins. Il existe une différence significative ($p < 0,01$) entre les veaux clonés et les veaux témoins que l'on peut facilement attribuer, à la vue du graphique, à la première semaine post-natale.

b- Veaux de 4 à 18 mois

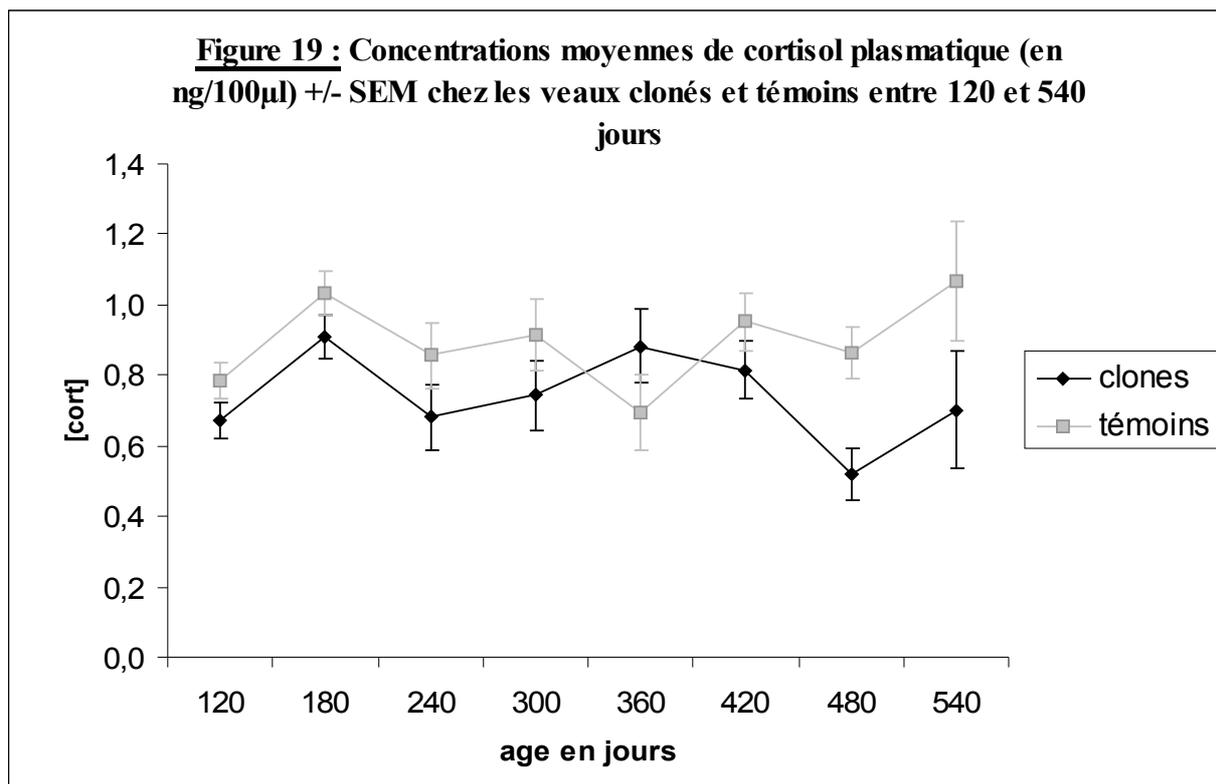
Les résultats obtenus pour le cortisol plasmatique chez les clones entre 4 à 18 mois (soit 120 à 540 jours) sont visibles dans les Tableaux 9 et 10 et sur la Figure 19

Tableau 9 : Moyennes des mesures du cortisol plasmatique (en ng/100µl) chez les veaux clonés et témoins entre 120 à 540 jours.

	Cortisol	
	clones	témoins
120	0,673	0,784
180	0,909	1,033
240	0,680	0,856
300	0,743	0,915
360	0,883	0,693
420	0,815	0,951
480	0,521	0,861
540	0,702	1,067

Tableau 10 : SEM des valeurs du cortisol plasmatique (en ng/100µl) chez les veaux clonés et témoins entre 120 et 540 jours.

Age en jours	SEM	
	clones	temoins
120	0,188	0,050
180	0,126	0,061
240	0,098	0,095
300	0,151	0,100
360	0,107	0,106
420	0,169	0,081
480	0,241	0,073
540	0,059	0,169



On observe des courbes similaires entre veaux témoins et veaux clonés dont les valeurs se situent autour de 0,8 ng/100µl. Il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les veaux clonés et les veaux témoins.

2. Triiodothyronine (T3)

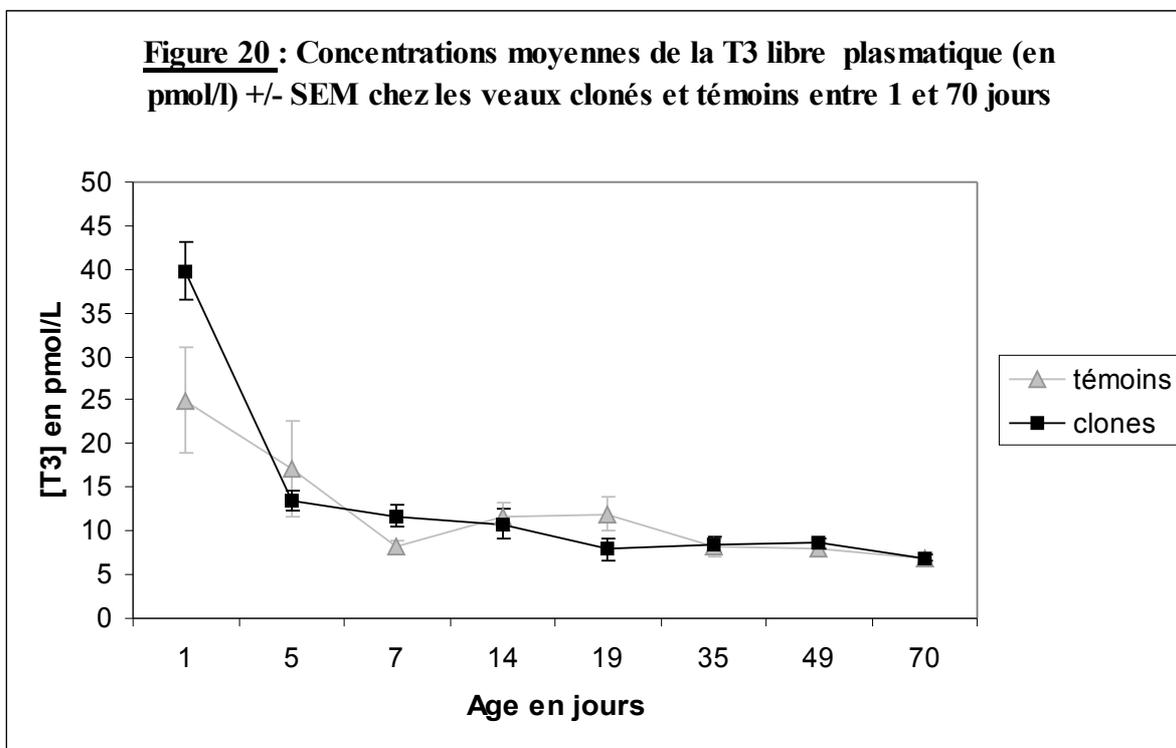
Les résultats des valeurs plasmatiques de triiodothyronine libre chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours sont visibles sur les Tableaux 11 et 12 et sur la Figure 20.

Tableau 11 : Moyennes des mesures du T3 libre plasmatique (pmol/l) chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours.

Age en jours	T3	
	Clones	témoins
1	39,834	24,970
5	13,544	17,023
7	11,71	8,217
14	10,832	11,680
19	7,89	11,983
35	8,438	8,202
49	8,596	8,007
70	6,936	6,900

Tableau 12 : SEM des mesures du T3 libre plasmatique (pmol/l) chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours.

Age en jours	T3	
	clones	témoins
1	3,212	6,009
5	1,146	5,492
7	1,301	0,695
14	1,693	1,571
19	1,293	1,918
35	0,845	1,034
49	0,624	0,610
70	0,281	0,558



On constate une forte chute du taux de T3 plasmatique libre lors de la première semaine de vie aussi bien chez les veaux clonés que chez les témoins : de 40 à 11 pmol/l pour les premiers et de 24 à 8 pmol/l pour les seconds. On note également une dispersion assez importante des valeurs, visualisée à l'aide des barres d'erreurs, lors de cette première semaine, plus marquée chez les témoins que chez les clones. Seule la valeur de T3 en J1 semble être notablement différente entre clones et témoins mais les tests statistiques ne rendent pas cette différence significative. Après J7 on observe des valeurs remarquablement constantes de T3 plasmatique libre et ce de façon identique chez les clones et chez les témoins. On remarquera également la très faible variabilité individuelle, au vu de la très petite taille des barres d'erreur.

3. Thyroxine (T4)

Les résultats des valeurs plasmatiques de thyroxine chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours sont visibles sur les Tableaux 13 et 14 et sur la Figure 21.

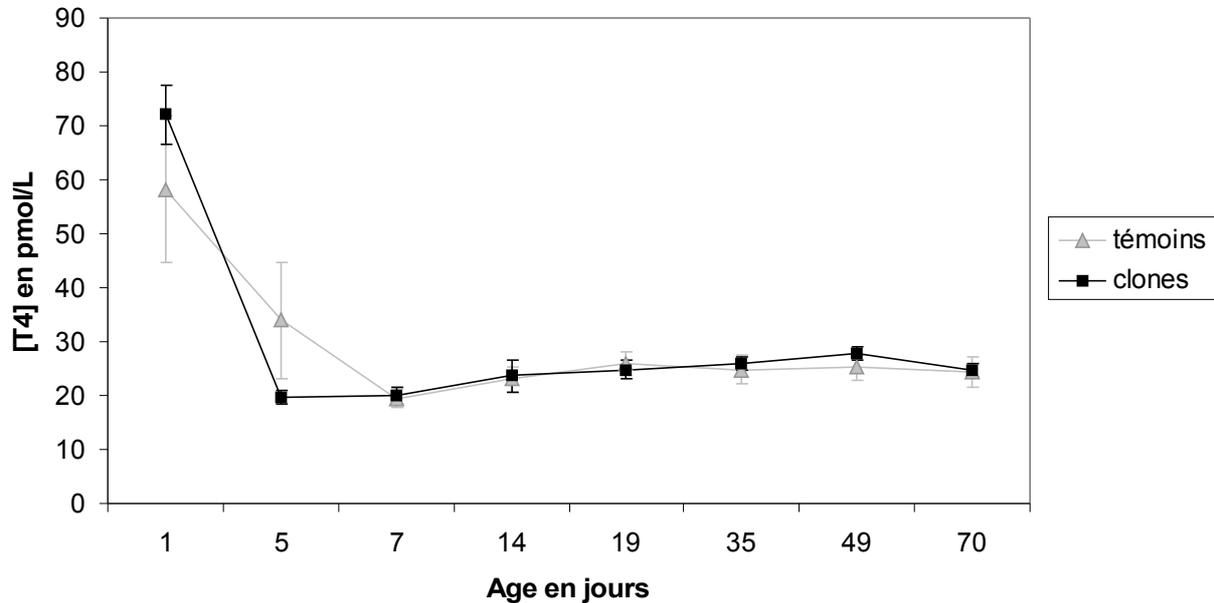
Tableau 13 : Moyennes des mesures du T4 libre plasmatique (en pmol/l) chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours.

Age en jours	T4	
	clones	témoins
1	72,05	58,228
5	19,704	33,910
7	20,05	19,498
14	23,71	23,075
19	24,836	26,008
35	25,908	24,842
49	27,762	25,243
70	24,724	24,386

Tableau 14 : SEM des mesures du T4 libre plasmatique (pmol/l) chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours.

Age en jours	T4	
	clones	témoins
1	5,564	13,554
5	1,317	10,918
7	1,543	1,738
14	2,967	2,312
19	1,864	2,162
35	1,258	2,715
49	1,285	2,282
70	1,313	2,735

Figure 21 : Concentrations moyennes de T4 libre plasmatique (pmol/l) +/- SEM chez les veaux clonés et témoins entre 1 et 70 jours



On constate une forte chute du taux de T4 plasmatique libre lors de la première semaine de vie (déjà constatée pour la T3 libre) aussi bien chez les veaux clonés que chez les témoins : de 72 à 20 pmol/l pour les premiers et de 58 à 19 pmol/l pour les seconds. On note cependant une plus grande dispersion des valeurs chez les témoins, matérialisée sur le graphique par des barres d'erreur assez importante à J1 et J5 alors que celles des clones sont minimales. Les valeurs mesurées dans les premiers jours de vie sont légèrement différentes entre clones et témoins mais pas de façon assez importante pour être validées par l'épreuve statistique. Puis à partir de J7 on peut voir clairement sur le graphique que les valeurs moyennes de T4 plasmatique libre sont identiques avec une très faible variabilité individuelle au regard des barres d'erreur.

III. Discussion

A. A propos des animaux

1. Choix des témoins

Nous avons choisi d'utiliser comme témoin des animaux issus d'Insémination Artificielle. On aurait pu leur préférer des veaux issus de la Fécondation *in Vitro*. En effet la technique de FIV est très proche de celle de clonage : les manipulations des ovocytes avant fécondation ou clonage, et les milieux de culture dans lesquels des embryons passent leurs 7 premiers jours sont les mêmes. De plus dans les deux cas, le futur embryon subit une stimulation électrique afin de faire fusionner les membranes plasmiques de l'ovocyte et de la cellule donneuse de noyau dans un cas, et du spermatozoïde dans l'autre cas. Enfin les embryons issus de clonage et de FIV subissent tous deux un transfert embryonnaire dans des génisses porteuses synchronisées.

La motivation du projet dans lequel s'inscrit cette étude est de déterminer si les bovins clonés sont des bovins normaux. En effet la problématique est de savoir si à terme il est possible de les faire entrer dans la chaîne alimentaire sans qu'ils présentent de risque et en garantissant une valeur nutritionnelle identique à celle de leurs congénères non clonés. Il nous apparaissait donc plus indiqué d'utiliser comme témoins des animaux les plus « normaux » possibles ; et à l'heure actuelle la technique de reproduction la plus utilisée en élevage laitier est l'insémination artificielle avec des paillettes congelées de sperme de taureaux sélectionnés.

D'autre part les différences de fonds génétiques entre les animaux n'ont pas été prises en compte. On pourrait souhaiter, afin de réellement comparer la méthode de reproduction, choisir comme témoins des veaux issus de la vache donneuse par reproduction sexuée. Une méthode simple serait de réaliser un transfert embryonnaire après fécondation *in vitro* d'ovocytes issus de la vache donneuse de fibroblastes. Cela nous aurait permis, en cas de réelles différences entre témoins et clones, de lever le biais d'une variabilité génétique individuelle. Cependant cette méthode est très lourde à mettre en œuvre et son rendement est lui aussi limité. Nous aurions alors pris le risque d'avoir très peu de témoins et pas forcément contemporains des veaux clonés. Nous avons préféré observer le devenir de veaux clonés dans des conditions classiques d'élevage.

2. Choix des clones

Notre étude concerne 5 individus clonés provenant de deux génotypes différents. On notera cependant que nous avons 4 représentants du génotype 5538 pour un seul représentant du génotype

029. La principale raison est que les tentatives de clonage avec le génotype 029 n'ont donné que quatre naissances et seulement 3 veaux vivants : 309, qui est présent dans notre étude, et 437 et 447 nés après la réalisation des dosages urinaires et plasmatiques. Il existe en effet des différences de rendement du clonage suivant le génotype utilisé de 3 à 25% (Heyman et al. 2005). Le clone 5538 est assez important avec 24 individus nés et 18 toujours vivants. On aurait souhaité disposer de plus d'individus issus de génotypes différents pour éviter l'expression artificiellement exacerbée d'une caractéristique individuelle propre à un fond génétique donné.

B- A propos des méthodes de mesures

1. Mesures urinaires

a- Mesures des catécholamines

L'HPLC nous paraissait une méthode de choix pour doser les marqueurs urinaires du stress. La technique a tenu ses promesses en ce qui concerne les catécholamines. En effet de petites adaptations des volumes des prises d'essai et des dilutions avant injection dans la chaîne ont été nécessaires afin d'obtenir des résultats précis et utilisables. Les méthodes d'extraction et de détection sont en outre extrêmement spécifiques des catécholamines ce qui a limité au maximum le bruit de fond permettant des mesures de pics précises et sans équivoque.

b- Mesures des glucocorticoïdes

Les dosages de glucocorticoïdes urinaires par HPLC avaient été mis au point, comme pour les catécholamines, pour l'étude du stress chez les porcs. Le problème auquel nous sommes heurtés est que les niveaux de glucocorticoïdes présents dans les urines de bovins sont très faibles et que la technique d'extraction est moins spécifique que celle des catécholamines. Ainsi malgré des adaptations quant aux volumes des prises d'essai et des manipulations très minutieuses nous n'avons pas été en mesure de faire ressortir sur les chromatogrammes les deux pics qui nous intéressaient à savoir cortisol et le standard interne. Après plusieurs tentatives et devant des résultats à chaque fois partiels et généralement non exploitables (absence de détection du standard interne par exemple) nous avons résolu d'arrêter le dosage des glucocorticoïdes urinaires en raison du manque de signification des résultats. Nous avons convenu de doser alors le cortisol plasmatique pour lequel les méthodes de détection ont fait leurs preuves chez les bovins.

2. Mesures plasmatiques

Les mesures plasmatiques ont été effectuées au moyen de tests immuno-chimiques régulièrement utilisés en routine. Il n'y a pas eu besoin d'adapter la méthode aux bovins. Les résultats obtenus nous ont semblé satisfaisants quant à leur qualité et nous ont permis une analyse des données. Les cortisolémies des veaux en bas âge et celles des veaux au-delà de 4 mois n'ont pas été dosées dans le même laboratoire pour des raisons d'organisation. Cependant notre but est de comparer les veaux clonés avec des veaux témoins du même âge, ce qui est possible avec les dosages réalisés. Les résultats aboutissent à des profils similaires chez les veaux clonés et chez les veaux témoins. De fait il ne nous a pas semblé utile de reproduire les dosages des cortisolémies des animaux au delà de 4 mois avec la technique utilisée en bas âge.

C- A propos des résultats obtenus

1. Températures rectales

Les résultats obtenus précédemment dans une première étude de ce projet avaient montré que les veaux clonés présentaient des températures corporelles significativement plus hautes que des veaux témoins des mêmes âges (Chavatte-Palmer et al. 2002 et 2004). Nous n'avons pas retrouvé cette différence chez nos animaux. Nous avons observé de fréquentes variations de températures rectales mais aussi bien chez les veaux clonés que chez nos veaux témoins. L'ensemble des températures rectales reste dans l'intervalle de normalité thermique quelque soit l'âge considéré. Cependant notre étude ne s'appuie que sur 5 clones et 6 veaux témoins alors que celles de 2004 intéressaient 21 veaux clonés. De plus elle ne concerne que deux génotypes. Lorsqu'on compare les températures moyennes du génotype 5538 et les températures du génotype 029 on ne constate pas non plus de différence significative.

2. Catécholamines urinaires

Les valeurs des catécholamines urinaires des veaux clonés ne sont pas statistiquement différentes de celles des veaux témoins. On observe une large variabilité individuelle tout au long des 18 mois de suivi chez les veaux témoins comme chez les veaux clonés ; c'est ce qui nous a conduit à utiliser des valeurs logarithmiques pour réaliser les analyses statistiques. Cependant cette variabilité individuelle est bien plus importante chez les veaux clonés. On ne s'explique pour l'instant pas cet effet.

3. Cortisol plasmatique

Seules les valeurs moyennes de cortisol plasmatique de J1 et J5 sont significativement différentes entre veaux témoins et veaux clonés. Ces derniers ont une cortisolémie très basse, autour de 45 à 50 ng/ml soit près du quart de la valeur des témoins à J1. Chavatte-Palmer et al. (2004) ont déjà fait ce constat. Ils ont alors mesuré la cortisolémie de veaux témoins nés par césarienne et ont constaté des valeurs basses du même ordre que celles observées chez les veaux clonés. Ce constat suggère qu'une cortisolémie basse pourrait être liée à la naissance par césarienne.

Après 7 jours, on ne distingue absolument pas les veaux clonés des veaux témoins par rapport à leur cortisolémie. De ce point de vue la on peut conclure que les veaux clonés sont des veaux tout à fait normaux quant au fonctionnement physiologique de l'axe corticotrope. On pourrait toutefois souhaiter avoir plus d'informations quant à son fonctionnement en situation de stimulation. Pour ce faire on peut imaginer une manipulation pour mettre en évidence une hyperactivation de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticotrope et donc un stress. Il s'agit de tests de stimulation à la CRH ou à l'ACTH et de freination à la dexaméthasone comme décrit dans le II.V-2.c- et couramment utilisés en pratique (Veissier et al. 1988, 2001 et Lensink et al. 2000). Les premiers résultats biochimiques obtenus et les constats cliniques ne nous ont pas poussés à mettre en œuvre ces protocoles.

4. T3 et T4 plasmatiques libres

Les valeurs plasmatiques d'hormones thyroïdiennes ne sont pas différentes entre le groupe des veaux clonés et celui des veaux témoins. Seule la valeur moyenne de T3 en J1 des veaux clonés est légèrement supérieure de celle des veaux témoins mais cette différence n'est pas suffisante pour que les veaux clonés soient significativement différents des veaux témoins. Le reste des valeurs moyennes ne permettent pas de différencier les veaux clonés des veaux témoins. Ainsi passée la période immédiatement néonatale, les veaux clonés apparaissent comme animaux normaux par rapport au fonctionnement physiologique de l'axe thyroïdien. Là encore on aurait pu mettre en place des tests fonctionnels de stimulation mais ils ne nous ont pas semblé nécessaires au vu des résultats des mesures isolées.

D- Les bovins clonés sont-ils des bovins normaux ?

1. Observations des veaux clonés avant le vêlage

Notre travail s'inscrit dans une étude plus large dont le but est de déterminer si les bovins clonés sont des animaux normaux. En effet il existe à l'heure actuelle un moratoire de l'INRA qui interdit l'introduction des clones ou de leurs produits dans la chaîne alimentaire. Chavatte-Palmer et al. (2004) rapportent les premiers résultats des travaux menés par l'INRA et citent ceux d'autres équipes telles que Hill et al. ou Souza et al. Ils ont observé des pertes fœtales importantes au tout début de la gestation d'une part, pour lesquelles est mise en cause la vascularisation des placentomes, et en toute fin de gestation d'autre part avec la mise en cause du LOS ou Large Offspring Syndrome. Il s'agit dans le dernier cas d'un excès pondéral du fœtus associé à des anomalies comme une hydroallantoïde, un développement anormal du placenta, un œdème et une réduction du nombre des placentomes, et une croissance asynchrone des organes. Ils observent également des gestations anormalement longues qui sont à l'origine de la décision de faire naître les veaux clonés par césarienne au terme de 282 jours de gestation si le vêlage ne s'est pas produit.

2. Observations sur les veaux morts à la naissance ou après.

Chavatte-Palmer et al. (2002 et 2004) ont également observé l'importance des mortalités per et néonatales chez les veaux clonés. Ils ont constaté des détresses respiratoires, des insuffisances cardiaques, des aplasies thymiques, des stéatoses hépatiques et des infections digestives notamment... Les taux de survies qu'ils ont calculé à partir de 59 veaux clonés nés sur l'exploitation de Bressonvilliers sont les suivants :

1 veau mort-né	(taux de survie à la naissance : 98,3%)
12 veaux morts dans les 48 premières heures	(taux de survie à 48 h : 78%)
9 veaux morts dans les 2 premiers mois	(taux de survie à 2 mois: 66,1%)
1 veau mort entre 2 et 6 mois	(taux de survie à 6 mois : 64,4%)
2 veaux morts entre 6 mois et l'âge adulte (au delà de 15 mois)	(taux de survie : 62,1%)

On constate que les mortalités sont assez importantes avant 2 mois, plus importantes que chez des veaux issus d'insémination artificielle et élevés dans les mêmes conditions. A noter que ces veaux sont suivis particulièrement scrupuleusement, plus que dans les conditions habituelles d'élevage en France.

3. Statut des veaux clonés par rapport aux veaux témoins

En regard de nos résultats et des observations faites par les équipes de l'INRA et par d'autres équipes nous sommes amenés à considérer les veaux selon deux périodes de leur vie. On constate que les principales anomalies observées chez les veaux clonés le sont pendant la gestation et en période néonatale jusqu'à l'âge de deux mois. C'est également dans cette période que nos résultats montrent une plus grande variabilité des valeurs individuelles de catécholamines urinaires chez les veaux clonés bien que celles-ci restent dans des échelles de valeurs physiologiquement normales. Par contre aucune anomalie n'a été constatée chez ces animaux après l'âge de 2 mois.

Ainsi les veaux clonés semblent légèrement différents des veaux témoins nés d'insémination artificielle jusqu'à l'âge de 2 mois sans pour autant être des bovins anormaux. Ils manifestent une plus grande variabilité individuelle, alors que 4 veaux sur 5 possèdent le même fond génétique... Au delà de cette date on n'observe aucune différence notable entre eux.

Conclusion

Le clonage somatique est une technique maintenant largement utilisée en laboratoire pour produire des individus génétiquement identiques. Si au départ cette méthode pouvait sembler un moyen judicieux pour gommer la variabilité individuelle, par exemple dans le cas de l'évaluation du potentiel génétique d'un taureau, des observations ont rapidement mis en évidence que des animaux clonés sont loin d'être des copies conformes. Notre travail s'intègre dans une étude beaucoup plus large dont l'objectif est de déterminer si les bovins clonés sont effectivement des bovins normaux comme ils le laissent paraître extérieurement. Il s'agit également d'évaluer la qualité de ces clones afin d'envisager de permettre leur entrée ou celle de leurs produits dans la filière alimentaire. Nos résultats ont montré qu'il n'existe pas de différences relatives aux marqueurs du stress mis à part pour la cortisolémie plus basse chez les veaux clonés à la naissance, et nous avons vu qu'il s'agissait d'un artéfact certainement dû à la naissance par césarienne. On peut en conclure que les veaux clonés ne sont pas plus ou moins sensibles au stress que les veaux témoins nés d'insémination artificielle.

Les résultats de l'étude globale, dans laquelle s'est inscrit notre travail, concluent au même état des lieux en ce qui concerne l'état clinique des veaux clonés ainsi que leur croissance, leur fertilité (mâles ou femelles) et leur production (laitière et carnée). Ainsi il pourrait être envisageable d'autoriser l'entrée dans la filière alimentaire de bovins clonés et/ou de leurs produits. Cette autorisation permettrait de consommer la viande et le lait produits par ces animaux (ces produits sont à l'heure actuelle détruits) mais aussi éventuellement aussi d'en utiliser certains dans un but thérapeutique et biomédical, par exemple en association avec la transgénèse. Imaginons une génisse génétiquement modifiée pour donner des facteurs humains de la coagulation dans son lait, elle pourrait être clonée une fois sa « mise au point achevée » afin de disposer d'une plus grande quantité de facteurs de la coagulation fabriqués par transgénèse. Il pourrait également être intéressant de cloner des taureaux à fort potentiel génétique afin d'en préserver le patrimoine génétique. Enfin le clonage pourrait être une solution palliative pour des espèces en voie d'extinction. En effet même si des individus clonés n'augmentent pas le potentiel génétique de l'espèce, ils accroissent les chances de survie et donc de reproduction sexuée, moteur de l'évolution. Cependant il n'est pas question, à l'heure actuelle, d'utiliser le clonage comme méthode de reproduction en élevages notamment du fait de son coût économique et technique.

Le clonage est une technique relativement répandue dans les laboratoires de biologie de la reproduction à travers le monde. Cependant des grandes inconnues limitent encore largement son efficacité. En effet elle s'améliore chaque année mais ne varie encore que de 0.3 à 6-7% maximum. Il n'est donc pas question aujourd'hui d'utiliser le clonage comme méthode de multiplication. Le choix des individus et du type de cellule donneuse de noyau influencent largement le taux de réussite (nombre de veaux vivants à la naissance/nombre d'embryons) : il semble qu'il y ait des génotypes et des lignées cellulaires qui se prêtent moins facilement au clonage. De plus les pertes fœtales et néonatales sont un obstacle éthique à une large diffusion : le clonage n'est pas encore sans danger ni pour la mère porteuse, ni pour le veau. Enfin les phénomènes épigénétiques, encore mal connus, apparaissent comme un obstacle supplémentaire à l'utilisation de clones comme outil d'expérimentation.

Notre travail s'inscrit dans une problématique très actuelle mais aussi très sensible. Nous sommes au début des études qui laissent apercevoir un large champ d'investigations tant en recherche fondamentale qu'en zootechnie ou en thérapeutique. Il conviendra toutefois de garder à l'esprit les contraintes éthiques inhérentes à ce sujet.

Bibliographie

1. BRADSHAW RH, PARROT RF, FORSLING ML, GOODE JA, LOYD DM, RODWAY RG et BROOM DM. (1996) Stress and travel sickness in pigs: effects of road transport on plasma concentrations of cortisol, β -endorphin and lysine vasopressin. *Anim. Sci.* 63: 507-516
2. BROOM DM (2003) Transport stress in cattle and sheep with details of physiological, ethological and other indicators *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 110:83-89
3. BROOM DM et JOHNSON KG (1993) Stress and animal welfare 1st ed. Chapman & hall
4. CHAVATTE-PALMER P, HEYMAN Y, RICHARD C, MONGET P, LeBOURHIS D, KANN G, CHILLIARD Y, VIGNON X et RENARD JP. (2002) Clinical, hormonal and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol. Reprod.* 66:1596-1603
5. CHAVATTE-PALMER P, REMY D, CORDONNIER C, RICHARD C, ISSENMAN H, LAIGRE P, HEYMAN Y et MIALOT JP. (2004) Health of cloned cattle at different ages. *Cloning Stem Cells.* 6 (2) 92- 98
6. CHAVATTE-PALMER P, DE SOUSA N, AIGRE P, CAMOUS S, PONTER AA, BECKERS J-F, HEYMAN Y. (2006) Ultrasound fetal measurements and pregnancy associated glycoprotein secretion in early pregnancy in cattle recipients carrying somatic clones. *Theriogenology*; in press
7. COMBRISSE H. 2003/2004 Système nerveux : thermoregulation et regulation du comportement alimentaire. Document de cours DCEV-2, 3-4 et 11-12
8. CONSTANT F, GUILLOMOT M, HEYMAN Y, VIGNON X, LAIGRE P, SERVELY J-L, RENARD J, CHAVATTE-PALMER P. (2006) Large Offspring or Large Placenta Syndrome ? Morphometric Analysis of Late Gestation Bovine Placentomes from Somatic Nuclear Transfer Pregnancies Complicated by Hydrallantois. *Biology of Reproduction*; In Press.
9. COOPER C, EVANS ACO, COOK S et RAWLINGS NC (1995) Cortisol, progesterone and β -endorphin response to stress in calves. *Can. J. Anim. Sci.* 95: 197-201
10. DANTZER R (1994) Méthodologie et critères en matière de bien-être des animaux. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 13 (1): 277-290

11. DANTZER R et MORMEDE P (1983) Stress in farm animals: a need for reevaluation *J. Anim. Sci.* 57 (1) 6-18
12. DOBSON H et SMITH RF (2000) What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim. Repro. Sci.* 60-61 : 743-752
13. DOBSON H, TEBBLE JE, SMITH RF et WARD WR (2001) Is stress really all that important ? *Therio.* 55:65-73
14. FAZIO E, MEDICA P, ALBERGHINA D, CAVALERI S et FERLAZZO A. (2005) Effect of long-distance road transport in thyroid and adrenal function and haematocrit values in Limousin cattle: influence of body weight decrease. *Vet. Res. Commun.* 29(8):713-719
15. FRASER D, RITCHIE JSD et FRASER AF (1975) The term stress in a veterinary context. *Br. Vet. J.* 131:653-662
16. GIESECKE WH (1985) The effect of stress on udder health of dairy cows. *Onderstepoort J. vet. Res.* 52:175-193
17. GOLUB MS et GERSHWIN ME (1985) Stress-induced immunomodulation : What is it, if it is ? *In: Animal stress.* 1st ed. American Physiological Society, Bethesda, Maryland
18. HAY M (1999) Mesure des glucocorticoïdes et des catécholamines urinaires chez le porc. Intérêt pour le bien-être animal. *Thèse pour le doctorat es sciences biologiques et médicales option neurosciences et pharmacologie* 202 pages.
19. HAY M et MORMEDE P (1997a) Determination of catecholamines and methoxycatecholamines excretion patterns in pig and rat urine by ion-exchange liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.* 703:15-23
20. HAY M et MORMEDE P (1997b) Improved determination of urinary cortisol and cortisone, or corticosterone and 11-dehydrocorticosterone by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr.* 702:33-39
21. HENRY JP et STEPHENS-LARSON P Specific effects of stress on disease processes *In : Animal stress.* 1st ed. American Physiological Society, Bethesda, Maryland
22. HEYMAN Y, CHAVATTE-PALMER P, LeBOURHIS D, CAMOUS S, VIGNON X et RENARD JP. (2002) Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol. Reprod.* 66:6-13

23. HEYMAN Y, CHAVATTE-PALMER P, VIGNON X, RICHARD C et RENARD JP (2005) Le clonage somatique : un état des lieux chez les bovines et les petits ruminants. *INRA Prod. Anim.* 18 (5) 339-354
24. HYDBRING E, MADEJ A, McDONALD E, DRUGGE-BOHOLM G, BERGLUND B et OLSSON K. (1999) Hormonal changes during parturition in heifers and goats are related to the phases and severity of labour. *J. Endocrinol.* 160(1):75-85
25. [Kvetnansky R](#), [Micutkova L](#), [Rychkova N](#), [Kubovcakova L](#), [Mravec B](#), [Filipenko M](#), [Sabban EL](#) et [Krizanova O](#). (2004) Quantitative evaluation of catecholamine enzymes gene expression in adrenal medulla and sympathetic Ganglia of stressed rats. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1018:405-4017
26. JANSSENS CJ, HELMOND FA et WIEGANT VM. (1995) The effect of chronic stress on plasma cortisol concentrations in cyclic female pigs depends on the time of day. *Domest. Anim. Endocrinol.* 12(2) : 167-177
27. LAUFFENGURGER J (1999) Evaluation du stress associé à la ponction folliculaire échoguidée chez la vache laitière. *Thèse pour le doctorat vétérinaire*. Alfort n°92. 77 pages.
28. LEFCOURT AM, BITMAN J, KAHL S et WOOD DL (1993) Circadian and ultradian rhythms of peripheral cortisol concentrations in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76:2607-2612
29. LEFCOURT AM et ELSASSER TH Adrenal responses of Angus x Hereford cattle to the stress of weaning. *J. Anim. Sci.* 73:2669-2676
30. LEMAIRE V, LeMOAL M et MORMEDE P. (1993) Regulation of catecholamine-synthesizing enzymes in adrenals of Wistar rats under chronic stress. *Am. J. Physiol.* 264: R957-962.
31. LENSINK BJ, FERNANDEZ X, BOIVIN X, PRADEL P, Le NEINDRE P et VEISSIER I (2000) The impact of gentle contacts on ease of handling, welfare and growth of calves and on quality of veal meat. *J. Anim. Sci.* 78:1219-1226
32. MAGDUB A, JOHNSON HD et BELYEA RL. (1982) Effect of environmental heat and dietary fiber on thyroid physiology of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 65(12):2323-2331
33. MELLOR DJ, STAFFORD KJ, TODD SE, LOWE TE, GREGORY NG, BRUCE RA et WARD RN (2002) A comparison of catecholamine and cortisol responses of young lambs and calves to painful husbandry procedures. *Aust. Vet. J.* 80 (4) 228-233
34. MILLER DB et O'CALLAGHAN JP (2002) Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism.* 51:6 (suppl. 1) 5-10

35. MINTON JE (1994) Function of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis and the Sympathetic System in models of acute stress in domestic farm animals. *J. Anim. Sci* 72:1891-1898
36. MOBERG GP (1985) Biological response to stress : key to assessment of animal well-being ?
In : Animal stress. 1st ed. American Physiological Society, Bethesda, Maryland
37. MORMEDE P (1988). Les réponses neuroendocriniennes de stress. *Rec. Méd. Vet.* p.723-741
38. MORMEDE P, LEMAIRE V, CASTANON N, DULLUC J, LAVAL M et LeMOAL M. (1990) Multiple neuroendocrine responses to chronic social stress: interaction between individual characteristics and situational factors. *Physiol. Behav.* 47 (6) :1099-1105
39. MORMEDE P (1995) Le stress : interaction animal-homme-environnement. *Cahiers Agricultures* 4:275-286
40. MÖSTL E et PALME R (2002) Hormones as indicators of stress. *Domest. Anim. Endocrino.* 23:67-74
41. OMS (1946) Préambule à la Constitution de l'Organisation mondiale de la Santé, tel qu'adopté par la Conférence internationale sur la Santé, New York, 19-22 juin 1946; signé le 22 juillet 1946 par les représentants de 61 Etats. 1946; (Actes officiels de l'Organisation mondiale de la Santé, n°. 2, p. 100) et entré en vigueur le 7 avril 1948.
42. OZIL JP, HEYMAN Y et RENARD JP. (1982) Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *Vet. Rec.* 110 : 126-127
43. PRATHER RS, BARNES F, SIMMS MM and coll. (1987) Nuclear transplantation in the bovine embryo. Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 37 : 859-866
44. STEPHENS DB et TONER JN (1975) Husbandry influences on some physiological parameters of emotional responses in calves. *Ap. Anim. Ethology.* 1:233-243
45. TILBROOK AJ, TURNER AI et CLARKE IJ (2000) Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals : the role of glucocorticoids and sex differences. *Rev. Repro* 5: 105-113
46. VEISSIER I, CHAZAL P, PRADEL P et Le NEINDRE P (1997) Providing social contacts and objects for nibbling moderates reactivity and oral behaviours in veal calves. *J. Anim. Sci* 75:356-365
47. VEISSIER I, RAMIREZ de la FE AR et PRADEL P (1998) Nonnutritive oral activities and stress responses of veal calves in relation to feeding and housing conditions. *App. Anim. Behav. Sci* 57:35-49

48. VEISSIER I, Van REENEN CG, ANDANSON S et LEUSHUIS IE (1999) Adrenocorticotrophic hormone and cortisol in calves after corticotrophin-releasing hormone. *J. Anim. Sci.* 77:2047-2053
49. VEISSIER I, BOISSY A, De PASSILLE AM, RUSHEN J, Van REENEN CG, ROUSSEL S, ANDANSON S et PRADEL P (2001) Calves' responses to repeated social regrouping and relocation. *J. Anim. Sci.* 79:2580-2593
50. VIGNON X, CHESNE P, LEBOURHIS D, FLECHON JE, HEYMAN Y, RENARD JP. Developmental potential of bovine embryos reconstructed with enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *C. R. Acad. Sci. Paris* 1998; 321: 735-745
51. WILLADSEN SM. (1986) Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320: 63-65
52. WILMUT I, SCHNIEKE AE, McWHIR IA et coll. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385 : 810-813

Annexes

Annexe 1: Protocole de dosage de la créatinine dans les urines

Mise à jour du 09/12/03

Utilisation du kit de dosage FISHER Créatinine (Réf.A4260107)

PREPARATION DES URINES

Allumer le spectro et la lampe VIS

Décongeler les urines

Transférer les urines dans des tubes numérotés de 3 à 20

Centrifuger les urines (15 min à 4°C à 4000 rpm pour des tubes et à 6500 rpm pour des eppendorf)

DOSAGE

- Numéroté 17 eppendorfs : de 3 à 20 pour la créatinine

Préparer la solution alcaline de picrate (dans un flacon à l'abri de la lumière) nécessaire pour la manip :

Pour 10 échantillons → 6.5ml R1 + 6.5ml R2

Pour 17 échantillons → 10ml R1 + 10ml R2

Diluer les urines au 1/5 pour la créatinine (dans les eppendorfs):

200µl d'urine + 800µl d'eau mQ

- Vortexer

Mettre 100µl d'eau mQ dans la cuve 1

Mettre 100µl de standard à 2 mg/dL dans la cuve 2

Mettre 100µl des dilutions dans les cuves de 3 à 20

Début du cycle :

A t=0, ajouter 1ml de solution alcaline de picrate (mettre des gants) dans la cuve 1

A t=30s, faire le blanc et lire la DO de la cuve 1 (Lecture 1A)
A t=1mn, ajouter 1ml de solution alcaline de picrate dans la cuve 2
A t=1mn30s, lire la DO de la cuve 2 (Lecture 2A)
A t=2min30s, lire la DO de la cuve 1 (Lecture 1B)
A t=3min30s, lire la DO de la cuve 2 (Lecture 2B) Fin du cycle

Refaire autant de cycles que nécessaire pour doser toutes les urines :

Annexe 2 : Fiche technique du kit de dosage de la créatinine urinaire



CREATININE ACIDE PICRIQUE

METHODE DIRECTE SANS DEPROTEINISATION

USAGE IN VITRO / ENREGISTRÉ A L'AGENCE DU MEDICAMENT, FRANCE (DOSSIER NO Z54110) CODE SFBC : RJ



CODE 80107 : 2 x 125 ml

PRINCIPE

En milieu alcalin, la créatinine donne avec l'acide picrique une coloration jaune orangée. La vitesse de développement de la coloration est proportionnelle à la concentration en créatinine.

REACTIFS

flacon R1	REACTIF ALCALIN	concentrations dans le milieu réactionnel
	Phosphate disodique	7 mmol/l
	Soude	115 mmol/l

flacon R2	REACTIF PICRATE	
	Dodécylsulfate sel de sodium	0,87 mmol/l
	Acide picrique pH 4	4,36 mmol/l

flacon R3	ETALON	concentration dans le flacon
	Créatinine	20 mg/l 177 µmol/l

PREPARATION DES REACTIFS

REACTIF ALCALIN : R1 1 volume
REACTIF PICRATE : R2 1 volume

NOTE : Les réactifs peuvent être utilisés séparément. Pour les automates, se reporter à la partie "PROGRAMMATION".
(Voir aussi le mode opératoire pour échantillons icteriques)

CONSERVATION

A +18 à +25°C jusqu'à la date de péremption du coffret.
Mélange réactif : 4 semaines à +4°C et à l'abri de la lumière.

ECHANTILLON

Sérum ou plasma hépariné. Urines diluées 1 + 49 avec de l'eau distillée. Ne pas utiliser d'urines acidifiées.
Echantillons icteriques : Procédure particulière (voir ci-dessous)

VALEURS USUELLES

Sérum	≤ 13 mg/l (≤ 115 µmol/l)
Urines	1 à 3 g/24 h (8,84 à 26,5 mmol/24 h)

BIBLIOGRAPHIE

BARTELS H., BOEHMER M. *Clin. Chim. Acta.* 1971, 32, 81-85.

MODE OPERATOIRE

Mesurer dans des cuves de lecture	Dosage	Etalon	Blanc (Facultatif)
Echantillon	100 µl		
Etalon		100 µl	
Eau distillée			100 µl
Réactif	1 ml	1 ml	1 ml

Bien mélanger. Après 30 secondes, enregistrer l'absorbance A1 à 490 nm (490-510) contre le blanc réactif ou l'eau distillée. Exactement 2 minutes après la première lecture, lire l'absorbance A2.

Echantillon icterique :

Incuber 100 µl d'échantillon dans 500 µl de R1 pendant 5 min.
Ajouter 500 µl de R2. Mélanger puis procéder comme ci-dessus pour les mesures d'absorbance.

- ♦ Trajet optique 1 cm
- ♦ Longueur d'onde 490 nm (490-510)
- ♦ Température 25°C, 30°C, 37°C

CALCUL

Concentration en créatinine =

$$\frac{(A2 - A1) \text{ Essai}}{(A2 - A1) \text{ Etalon}} \times \text{concentration de l'étalon}$$

LINEARITE

Pour des taux > 150 mg/l, diluer 1 + 4 avec de l'eau distillée. Tenir compte de la dilution dans le calcul du résultat (multiplier le résultat par 5).

REMARQUES

La réaction est très sensible à la température. Les températures et les temps de réaction doivent être identiques pour l'étalon et les échantillons à doser. Pour cela le mélange réactif et les échantillons doivent être portés à la température de mesure.

Annexe 3: Protocole de dosage des catecholamines libres dans les urines par HPLC

PREPARATION DES STANDARDS Tous les lundis

Ils sont préparés pour plusieurs jours et conservés dans le frigo de la salle HPLC

Etalons congelés à -20°C

Pool catécholamines (NA, A, DHBA, DA) : Congelés en aliquots de 0.5ml env. à $100\mu\text{g/ml}$

Standard Interne (DHBA) : Congelés en aliquots de 0.5ml env. à $100\mu\text{g/ml}$

Pour l'extraction :

Diluer les pools au 1/50 ($2\mu\text{g/ml}$) : P/50 : Dilution PC1 dans un eppendorf jaune

Sert pour plusieurs fois (toute la semaine en général)

PC 1 : 20 μl PC + 980 μl de phase mobile à 12%

Diluer les SI (DHBA) au 1/50 ($2\mu\text{g/ml}$) : SI/50 : Dans tube de 15 ml bouchable

Sert pour plusieurs fois (généralement, il est nécessaire d'en refaire en cours de semaine ; dans ce cas reprendre le même eppendorf de solution mère).

200 μl DHBA + 9800 μl de phase mobile à 12%

PREPARATION DES URINES

Centrifuger les urines à 3500 G pendant 15 min

Numéroter les béchers de 1 à 20

Dans les béchers 1 et 2(test) mettre :

° 100 μl du PC1 (PC/50) à $2\mu\text{g/ml}$ soit 200 ng

° Une quantité d'eau mQ équivalente en gros à la prise d'essai utilisée pour les urines (5ml)

° 8 ml d'EDTA pour les porcs (sol. fille à 3 g/l élaborée en diluant au 1/10 la solution mère d'EDTA à 30 g/l.) et 15ml d'EDTA pour les rats (sol° fille à 1g/l)

Pour préparer l'EDTA à partir de la solution mère utiliser l'eau osmosée car le pH est très difficile à ajuster avec l'eau mQ.

Dans les autres béchers mettre :

° 100 μl du SI/50 (DISTRIPETTE) à $2\mu\text{g/ml}$ soit 200 ng. Conseil : transvaser dans un tube la quantité de SI nécessaire pour une série. Evite de contaminer le tube et permet de vérifier qu'il y a assez de SI pour la série entière.

Anne-Claire BRISVILLE

- ° La prise d'essai d'urine déterminée après dosage de la créatinine : 4 à 10 ml pour les porcs et 0.75 à 2.5 ml pour les rats
- ° 8 ml d'EDTA pour les porcs (sol. fille à 3 g/l élaborée en diluant au 1/10 la solution mère à 30 g/l) et 15ml d'EDTA pour les rats (sol° fille à 1g/l)

AJUSTEMENT DES pH

Amener le pH dans chacun des béchers à 6.5 (6.45 à 6.55) avec de la soude NaOH à 5N, 1N, 0.1N, 0.01N et du HCl à 6N, 1N, 0.1N, 0.01N (attention aux tests : ne pas utiliser la soude à 5N car virage rapide)

Avant la fin de la série agiter les colonnes cationiques (pour resolubiliser toute la résine) puis les déboucher (Les colonnes se conservent à 4°C et sont réutilisables 15 à 30 fois)

Si les colonnes ont été recyclées : rincer avec du tampon phosphate après écoulement du tampon phosphate de stockage (tampon dans le frigo)

EXTRACTION DES CATECHOLAMINES

Marquer le compteur des colonnes

Faire couler les « tests » et les urines sur les colonnes

Numéroter les grands tubes de 1 à 20 et les eppendorfs de 1 à 20 avec une répétition pour chacun

Rincer les béchers avec 10ml d'eau mQ et verser sur les colonnes

Laver les béchers

Rincer 2 fois avec de l'eau mQ (10ml puis 5ml)

Mettre les tubes à essai numérotés sous les colonnes et éluer avec 6ml d'acide borique (2 fois 3ml par pipetage rapide)

Vortexer

Congeler 1ml des éluats à -80°C

Diluer les éluats : 100µl éluat + 200µl phase (DISTRIPIPETTE). Vortexer

REGENERATION DES COLONNES

Sous la hotte faire couler 10 ml de NH₄OH, 2N sur les colonnes

Anne-Claire BRISVILLE

Laver 2 fois avec de l'eau mQ (2 * 10ml) la première fois sous la hotte

Laver 2 fois avec du tampon phosphate (2 * 10ml)

Boucher les colonnes avant la fin du second lavage et conserver dans un portoir posé sur un plateau contenant du tampon phosphate à 4°C. Attention bien boucher les colonnes !

Remettre les urines dans les flacons de prélèvement congelés

Retirer les GC de l'évaporateur et éteindre le refroidisseur

INJECTION sur la chaîne HP 1100

Réaliser une purge avec cette phase mobile :

- ° Eteindre la pompe → débit = 0 (set up pump)
- ° Placer la phase mobile
- ° Ouvrir la pompe avec le bouton noir situé sur la pompe
- ° Augmenter le débit à 10
- ° Faire aspirer une bulle d'air
- ° Attendre le passage de la bulle puis remettre le débit à 0
- ° Fermer la pompe avec le bouton noir
- ° Régler le débit à 0.6

Rincer le système pendant 2 heures sans recycler

Au bout de 2 heures :

- ° Recycler la phase mobile
- ° Ouvrir la cellule du DECADE
 - .Cell OFF → Cell ON en appuyant sur la touche en face
- ° Attendre 30 min

Au bout de 30 min :

- ° Le courant doit être d'environ 2 nA (on le visualise en appuyant sur STATUS)
- ° Faire le zéro : A-Zéro quand on est sur STATUS

Injection du standard PC3 :

- ° Dilution du pool catécholamines au 1/10000 (10ng/ml)

Se servir de la solution PC1 (1/50)

50µl de PC1 + 950µl de phase mobile à 10% (1/20) : PC2

Anne-Claire BRISVILLE

100µL de PC2 + 900µL de phase mobile à 10% (1/10) : PC3
= PC calib

° On injecte 120µl de PC3 au moins 2 fois pour vérifier si les temps de rétention des pics sont constants

° On règle dans set up pump : * Stop time : 21 min

* Post time : 1 min

° Régler la t°C du plateau : * On clique sur la seringue

* Thermostat : OFF →ON 4°C

Calibration :

Si le dernier PC3 est stable, faire la calibration des pics

° Dans DATA ANALYSIS

- Calibration

- Recalibrate

- Mode Replace puis OK

- Imprimer la calibration (cliquer sur l'icône imprimante)

° Revenir dans METHOD AND RUN CONTROL

Préparer les échantillons

° Décongeler les eppendorfs et vortexer

° Diluer les éluats de catécholamines sinon on obtient des dédoublement des pics

- Dilution au quart (selon essai avec un des échantillons)

exemple dilution au quart : **300µl phase mobile + 100µl éluats**

- Vortexer

° Mettre 120µl de l'éluat dilué dans les petites fioles à HPLC (Numéroter les fioles) ATTENTION
AUX BULLES !

Introduire les fioles sur le plateau

Indiquer le nombre de fioles déposées sur le plateau

° Cliquer sur le plateau

° Indiquer le nb d'échantillon, la méthode utilisée et le nb d'injection par fiole → OK

° Remplir le tableau avec le nom des échantillons

° puis faire OK

Annexe 4 : Protocole de dosage des glucocorticoïdes urinaires par HPLC

Mise à jour du 18/11/03

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

- Après décongélation et centrifugation des urines (tubes en polypropylène ; 3500-4000G pendant 15 min) filtrer avec des filtres ronds à usage unique (0,22 µm) à l'aide d'une seringue au dessus de tubes en polypropylène de 10ml.
- On filtre une quantité légèrement supérieure à la quantité d'urine utilisée pour le dosage (cf pertes au moment de la filtration : 0,5 ml de plus suffisent). Pour connaître les volumes d'urine nécessaire, se reporter aux tables de correspondance créatininurie – volume de la prise d'essai utilisée dans les manip précédentes réalisés sur le même type d'animaux.
- Pour les tubes 2 et 3, filtrer le volume d'urine * 2 + 0,5 ml

ALIQUOTAGE

- Numéroté une série de tube à hémolyse de 1 à 20
- Dans les tubes 1 et 2 (tubes test) mettre 40 µl de pool PC100 à 1ng/µl (=100ng/ 100µl), soit 40ng (avec une P200)
Compléter le tube à 8 ml avec de l'eau mQ
Ces tests servent à calculer le rendement de l'extraction pour chacun des composés
- Dans les autres tubes (3 à 20) mettre : 40µl de SI100 (substance S à 1ng/ml = 100ng/100ml) soit 40ng à la distripipette
Distribuer les volumes d'urines dans les tubes 3 à 20 : volumes issus du dosage de la créatininurie
Compléter les tubes à 8ml avec de l'eau mQ
- recouvrir de parafilm et vortexer

Allumer le refroidisseur et marquer le compteur à cartouches

EXTRACTION

- Régler le vide à 0,2 bars environ (1 à 2 gouttes par sec)
- Régénérer les cartouches d'extraction MF C18 (réutilisables 15 fois)
- Remplir les cartouches avec de l'éthanol absolu
- Remplir les cartouches avec de l'eau mQ
- Déposer les échantillons dans les cartouches
- Rincer les tubes avec 3ml d'eau mQ et passer sur les cartouches

Anne-Claire BRISVILLE

Rincer avec de l'eau mQ pour entraîner les gouttes résiduelles sur les cartouches (remplir les cartouches)

Rincer avec 3 ml de NaOH 0,01N-MetOH (70-30%) ETAPE IMPORTANTE

Rincer deux fois avec 3ml d'eau mQ

Rincer avec 3 ml de HCl 0,01N-MetOH (70-30%) ETAPE IMPORTANTE

Rincer deux fois avec 3ml d'eau mQ

Numéroter 20 tubes à hémolyse de 5ml de 1 à 20

Placer les tubes sur un portoir sous les cartouches

Eluer avec 3 ml d'éthanol

EVAPORATION

Avec ou sans chauffage (45 à 60°C) durant 3 à 4 heures, sous vide dans l'évaporateur

PRÉPARATION DE L'INJECTION

reprendre les résidus secs avec 120µl de phase mobile pour les chaînes HP 1100

vortexer puis centrifuger à 800-1000G quelques secondes pour récupérer ce qui se trouve sur les parois des tubes

reprendre les 120µl et les déposer dans des fioles à HPLC numérotées

INJECTION DANS LA CHAÎNE HP 1100

Annexe 5 : Chromatogrammes des glucocorticoïdes de 3 échantillons : mises en évidence du bruit de fond et de l'absence de ligne de base sur certains chromatogrammes.

