

Physiologie

LE STRESS THERMIQUE PROVOQUE LA MORTALITÉ DES LYMPHOCYTES CHEZ LES OVINS DE RACE BARBARINE

par

Imen BELHADJ SLIMEN^{1,2}, Abdeljelil GHRAM³, Taha NAJAR^{1,2},

Manef ABDREBBAH² et Moncef BEN M'RAD¹

Le stress thermique est associé avec une diminution de la réponse immunitaire chez les animaux d'élevage. Le stress thermique pourrait induire une mortalité des cellules immunitaires en réponse à l'augmentation de la température corporelle des animaux. L'objectif de cet essai est d'étudier l'effet de l'intensité et de la durée du stress thermique sur la viabilité des lymphocytes chez des agneaux de la race Barbarine. Les lymphocytes sont isolés à partir du sang total par la technique du Ficoll-Paque et cultivés dans un milieu RPMI 1640. La simulation du stress thermique a été générée en utilisant un bain-marie, les températures d'exposition ont été choisies suite à l'étude de la variation de la température rectale des ovins en fonction du THI. Le lot témoin a été exposé à une température de 39°C, alors que les lots expérimentaux ont été gardés dans des températures de 40°C et de 41°C. La durée d'exposition a varié de 1 h à 6 h. Les résultats obtenus montrent que le taux de mortalité des lymphocytes varie avec l'intensité de la température ambiante de 0 % à 39°C à 54,6 % à 41°C ($p < 0,05$) et que la durée d'exposition influence le nombre des lymphocytes viables qui diminue de 98 % à 76 % entre 1 h et 6 h d'exposition à une température de 40°C ($p < 0,05$). L'interaction entre l'intensité et la durée du stress thermique est significative ($p < 0,05$). Nos résultats montrent

1. Département Ressources animales, halieutiques et de Technologie agroalimentaire, Institut national agronomique de Tunisie, 43, avenue Charles Nicolle, 1082 Tunis, Tunisie.

2. Laboratoire Matériaux, molécules et applications, Institut préparatoire aux études scientifiques et techniques, route de Sidi Bou Saïd, BP 51, 2076 La Marsa, Tunis, Tunisie.

3. Laboratoire de Microbiologie, Institut Pasteur de Tunisie, 13, place Pasteur, BP 74, 1002 Tunis, Belvédère, Tunisie.

Auteur correspondant : Mlle Belhadj Slimen Imen, belhadj_slimen_imen@yahoo.fr.

Bulletin de la Société zoologique de France 140 (2)

aussi que les cellules immunitaires sont capables de résister à un stress thermique de courte durée, ce qui implique la mise en œuvre des mécanismes de résistance. L'intensité et la durée du stress thermique induisent la mortalité des lymphocytes, probablement via des mécanismes de signalisation cellulaire.

Mots-clés : stress thermique, lymphocytes, mortalité.

Heat stress induces mortality of Barbary sheep lymphocytes

Environmentally-induced heat stress may be associated with immunosuppression and inhibition of lymphocyte proliferation, in response to increased body temperature in farm animals. This study was carried out to ascertain how the level and duration of heat stress affect the viability of lymphocytes in Barbary lambs. Lymphocytes were isolated using the Ficoll-Paque technique and cultivated in RPMI 1640 medium. The heat stress was generated using a water bath. Stress temperatures were used based on a meta-analysis of rectal temperature variation in response to THI (Temperature-Humidity Index). The control group was kept at 39°C, whereas experimental groups were exposed to 40°C and 41°C. The duration of thermal stress varied from 1 h to 6 h. Our results show that the lymphocyte mortality rate depends on both the level and the duration of heat stress, and varied from 0 % at 39 °C to 54.6 % at 41°C ($p < 0.05$). The proportion of viable lymphocytes decreased from 98 % to 76 % between 1 h and 6 h at 40°C ($p < 0.05$). Moreover, the results obtained show that lymphocytes are thermo-resistant to short-term heat stress. The level and duration of heat stress probably induce the mortality of lymphocytes through signaling pathways.

Keywords: heat stress, lymphocytes, mortality.

Introduction

Dans le contexte global du réchauffement climatique, le stress thermique sollicite l'intérêt des chercheurs, des agents de développement et des éleveurs, du moment où il présente un impact sur l'économie de l'éleveur ainsi que la santé et les performances de production et de reproduction des animaux d'élevage.

L'indice de température-humidité (THI) permet d'évaluer la sévérité du stress thermique tout en mettant en relation la température ambiante et l'humidité relative du milieu environnant. Ainsi, pour des valeurs de THI inférieures à 70, l'animal est considéré dans un état confortable. Des valeurs de THI entre 75 et 78 sont considérées stressantes. L'animal est sévèrement stressé si les valeurs de THI dépassent 78 (SILANIKOVE, 2000).

En réponse à des valeurs stressantes de THI et lorsque l'organisme n'arrive pas à dissiper l'excès de chaleur accumulée, la température rectale (TR) des agneaux augmente. Cette augmentation est accompagnée d'une chute plus ou moins importante des performances de production ainsi que d'un affaiblissement de la réponse immunitaire. Dans ce contexte, plusieurs auteurs ont rapporté la diminution du nombre de lymphocytes chez les ovins hyperthermiques (DE ALVARENGA *et al.*, 2013). Le présent travail s'intéresse à élucider les mécanismes déterminant cette diminution en supposant que l'augmentation de la température rectale des agneaux provoque la mortalité des lymphocytes.

Mortalité des lymphocytes induite par l'hyperthermie

Matériel et méthodes

Étude la variation de la température rectale des ovins

192 observations reportées par plusieurs travaux de recherche se rapportant au thème du stress thermique chez les ovins ont été utilisées pour le calcul du THI, tel que résumé dans le tableau 1. Le THI a été calculé selon la formule suivante (THOM, 1959) :

$$\text{THI} = 0,8^{\circ} \text{Ta} + [(\text{humidité relative}/100) \cdot (\text{Ta} - 14,3)] + 46,4$$

avec Ta = température ambiante (°C).

Tableau 1

Statistiques descriptives des variables retenues.
Statistics values for the parameters studied.

Variabes	n	Moyenne	Minimum	Maximum
THI	190	75,05	47,44	111,89
Humidité relative (%)	173	58,08	5,29	93
Température ambiante (°C)	173	27,21	8,96	50
Température rectale (°C)	191	39,2	37,07	41,2

Isolement et culture des lymphocytes

Des prélèvements de 5 ml de sang frais (obtenu à partir de la veine jugulaire chez des agneaux sains) ont été mélangés avec 5 ml de RPMI 1640 puis déposés sur 5 ml de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Après centrifugation à 1989 rpm pendant 30 min, la bande blanche de lymphocytes a été suspendue à nouveau dans 5 ml de RPMI puis centrifugée à 2455 rpm pendant 15 min. Cette étape de lavage a été répétée 3 fois. Les lymphocytes ont été cultivés à une concentration finale de 5,5.10⁶ cellules viables/ml, en présence de 10 % SVF et 1 % d'antibiotiques, à 37°C, dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂ et 95 % d'air.

Installation du stress thermique

Le stress thermique a été provoqué en mettant les lymphocytes dans un bain-marie pendant des temps croissants, jusqu'à 6 h. Les températures d'exposition ont été choisies en fonction des résultats de la partie méta-analyse (39°C, 40°C et 41 °C). Les lymphocytes viables ont été comptés après 1 h, 2 h, 4 h et 6 h d'exposition.

Test de viabilité des lymphocytes

Les lymphocytes morts ont été déterminés en utilisant la coloration au bleu de Trypan (0,4 %). Le comptage des lymphocytes a été fait à l'aide d'un hémacytomètre (Neubauer), sous observation microscopique.

Analyse statistique

Trois répétitions ont été effectuées pour chaque test. L'analyse statistique a été faite en utilisant le complément XLSTAT de Microsoft Excel. Des analyses de la variance et de régression linéaire multiple ont été réalisées. Les résultats sont considérés significatifs si la p-value calculée est au moins inférieure à 0,05.

Résultats

Variation de la température rectale des ovins en fonction du THI

Les résultats de la régression linéaire montrent que la température rectale des ovins augmente parallèlement au THI, et plus précisément à partir des valeurs de THI supérieures à 75, comme représenté dans la figure 1. Lorsque le THI augmente de 5 points, la température rectale des ovins augmente de 0,19°C.

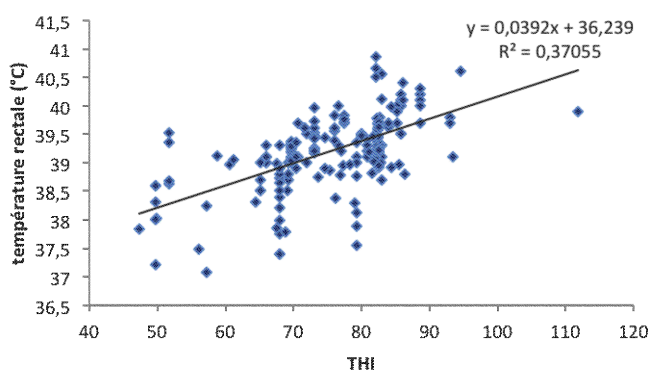


Figure 1

Évolution de la température rectale des ovins en fonction du THI.
Plot of rectal temperature values as a function of THI (Temperature-Humidity Index).

Cependant, quelques ovins ont réussi à maintenir une température rectale normale, indépendamment de l'augmentation du THI, indiquant une résistance à l'hyperthermie.

Les valeurs étudiées de la température rectale varient entre 37,07°C (min) et 41,2°C (max), avec une moyenne de 39,2°C. Ainsi, nous avons sélectionné 3 températures physiologiques, à savoir 39°C, 40°C et 41°C, sous lesquelles la viabilité des lymphocytes a été étudiée.

Effet du stress thermique sur la viabilité des lymphocytes

La figure 2 montre une cinétique normale des lymphocytes exposés à une température de 39°C. On remarque même une légère prolifération à partir de la cinquième heure. On peut donc conclure que la température physiologique de la race Barbarine est 39°C.

Mortalité des lymphocytes induite par l'hyperthermie

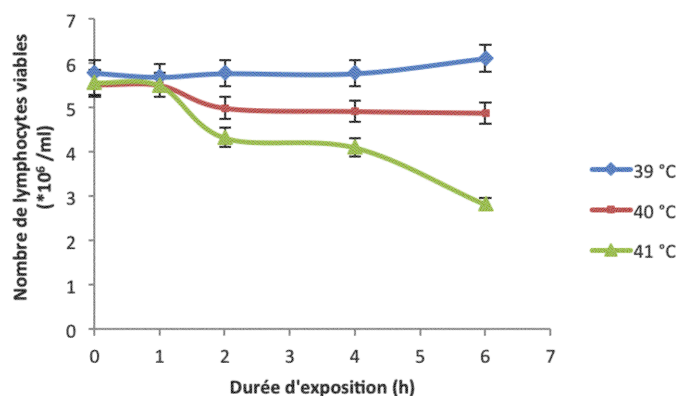


Figure 2

Cinétique de la viabilité des lymphocytes sous différentes températures et durées de stress.
Kinetics of lymphocyte viability as affected by the level and duration of heat stress.

Cependant, le nombre de lymphocytes exposés à 40°C et à 41°C diminue significativement ($p < 0,0001$) à partir de la première heure. Cette diminution est fonction de la sévérité et de la durée du stress ($p = 0,012$). Ainsi, le taux de mortalité observé après 6 heures d'exposition à une température de 40°C est de 11,33 %. Ce taux passe à 49,31 % lorsque la température d'exposition augmente de 1°C (Tableau 2).

Tableau 2

Évolution de taux de mortalité des lymphocytes (%)
 en fonction de la température et de la durée d'exposition.
Lymphocyte mortality rates under different levels and durations of heat exposure.

	Température (°C)			TC	Valeur de p	
	39	40	41		Durée	TC*Durée
1h	0	0	1,26	<0,0001	0,013	0,012
2h	0	9,33	22,32			
4h	0	10,67	26,27			
6h	0	11,33	49,31			

Une régression linéaire multiple a permis de modéliser la variation de la température rectale des ovins en fonction de la température et de la durée d'exposition. La signification des paramètres utilisés dans le modèle est représentée dans le Tableau 3.

Nombre de lymphocytes viables = $4,29 \cdot 10^7 - 9,29 \cdot 10^5 * TC - 1,78 \cdot 10^5 * \text{Durée d'exposition}$ ($R^2 = 0,565$).

Bulletin de la Société zoologique de France 140 (2)

Tableau 3

Analyse des paramètres du modèle de la régression linéaire multiple.
Multiple linear regression parameters.

Paramètre	valeur de p
Modèle	< 0,0001
Constante	< 0,0001
Température (TC)	< 0,0001
Durée	0,002

Discussion

La température rectale est un paramètre physiologique central indiquant l'état de santé des animaux. Chez les ovins, la température rectale moyenne varie entre 38,8°C et 39,3°C en conditions de thermoneutralité (DA SILVA & MINOMO, 1995). Les résultats de la méta-analyse montrent que la température rectale des ovins évolue positivement en réponse à l'augmentation du THI, indiquant que les ovins hyperthermiques échouent à dissiper l'excès de chaleur accumulée dans leur organisme. De ce fait, le stress thermique peut être considéré comme un agent perturbateur de l'homéostasie des ovins. Cependant, le stress thermique semble être race-dépendant, puisque plusieurs animaux ont réussi à maintenir une température rectale normale lorsque le THI augmente au-dessus de 75 (PAULA-LOPES *et al.*, 2003 ; KAMWANJA *et al.*, 1994).

In vitro, une relation directe a été observée entre l'augmentation de la température environnante et la mortalité des lymphocytes. On a réussi à confirmer la cytotoxicité du stress thermique. Nos résultats sont légèrement supérieurs à ceux reportés par ROMERO *et al.* (2013). D'autres travaux ont confirmé la suppression de la blastogénèse des lymphocytes ovins soumis à un stress thermique chronique (NIWANO *et al.*, 1990). En outre, LACETERA *et al.* (2009) ont reporté que le stress thermique altère la synthèse de l'ADN par les cellules mononucléaires bovines. *In vivo*, plusieurs auteurs ont reporté la diminution du nombre des lymphocytes viables durant la période du stress thermique (DE ALVARENGA *et al.*, 2013 ; LIU *et al.*, 2012).

La résistance observée durant les deux premières heures de l'exposition peut être due à l'action des protéines du choc thermique (HSP) (ROMERO *et al.*, 2013 ; AGNEW & COLDITZ, 2008). GUERRIERO & RAYNESS (1990) ont montré que ces protéines sont synthétisées durant les 60 minutes qui suivent le choc thermique. De même, cette résistance peut être induite par la mobilisation du système antioxydant cellulaire (KATARIA *et al.*, 2013 ; NEZHAD *et al.*, 2013). De ce fait, la supplémentation en antioxydants pourrait avoir un rôle thermoprotecteur.

Mortalité des lymphocytes induite par l'hyperthermie

Conclusion

Le stress thermique induit par l'augmentation de la température ambiante provoque l'augmentation de la température physiologique des animaux et la diminution du nombre de lymphocytes viables *in vivo* et *in vitro*. Le mécanisme par lequel le stress thermique induit la mortalité des lymphocytes reste à déterminer : s'agit-il d'une apoptose, d'une nécrose ou bien d'une autophagie ?

RÉFÉRENCES

- AGNEW, L.L. & COLDITZ, I.G. (2008).- Development of a method of measuring cellular stress in cattle and sheep. *Vet. Immunol. Immunop.*, **123**, 197-204.
- DASILVA, R.G. & MINOMO, F.R. (1995).- Circadian and seasonal variation of the body temperature of sheep in a tropical environment. *Int. J. Biometeorol.*, **39**, 69-73.
- DE ALVARENGA, A.B.B., LMA DALLAGO BS, MCMANUS, C., RAMOS, A.F., DE MENEREZ, A.M., DE ALMEIDA, A.M.B. & BERNAL, F.E.M. (2013).- Physiological parameters in different breeds of rams as a measure of adaptation to environmental conditions in the Federal District-Brazil. *Int. J. Anim. Vet. Adv.*, **5** (6), 256-263.
- GUERRIERO, V., Jr. & RAYNESS, D.A. (1990).- Synthesis of heat stress proteins in lymphocytes from livestock. *J. Anim. Sci.*, **68**, 2779-2783.
- KAMWANJA, L.A., CHASE, C.C., GUTTIERREZ, J.A., GUERRIERO, V., OLSON, T.A., HAMMOND, A.C. & HANSEN, P.J. (1994).- Responses of bovine lymphocytes to heat shock as modified by breed and antioxidant status. *J. Anim. Sci.*, **72**, 438-444.
- KATARIA, N., ABHIMANU, ARORA, S., SHARMA, A., MAAN, R., SOREN, S., KATARIA, A.K., MOHAMMAD, N., PILANIA, P.K., SANKHALA, L.N., THORI, M.K., GAUR, J.S. & MEENA, A. (2013).- Status of free radical scavenging enzymes in heat stressed Rathi calves. *Vet. Res.*, **6** (1), 19-22.
- LACETERA, N., BERNABUCCI, U., BASIRICO, L., MORERA, P. & NARDONE, A. (2009).- Heat shock impairs DNA synthesis and down-regulates gene expression for leptin and Ob-Rb receptor in concanavalin A-stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. *Vet. Immunol. Immunop.*, **127**, 190-194.
- LIU, H.W., CAO, Y. & ZHOU, D.W. (2012).- Effects of shade on welfare and meat quality of grazing sheep under high ambient temperature. *J. Anim. Sci.*, **90**, 4764-4770.
- NEZHAD, F.S., LAVVAF, A. & KARIMI, S. (2013).- Effect of heat stress on oxidative reactions in the sheep Sertoli cells. *Int. J. Agric.Crop Sci.*, **12**, 833-839.
- NIWANO, Y., BECKER, B.A., MITRA, R., CALDWELL, C.W., ABDALLA, E.B. & JOHNSON, H.D. (1990).- Suppressed peripheral blood lymphocyte blastogenesis in pre- and postpartal sheep by chronic heat stress, and suppressive property of heat-stressed sheep serum on lymphocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, **14**, 139-149.
- PAULA-LOPES, F.F., CHASE, C.C. JR., AL-KATANANI, Y.M., KRININGER, III C.E., RIVERA, R.M., TEKIN, S., MAJEWSKI, A.C., OCON, O.M., OLSON, T.A. & HANSEN, P.J. (2003).- Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction*, **125**, 285-294.
- ROMERO, R.D., PARDO, A.M., MONTALDO, H.H., RODRÍGUEZ, A.D. & CERÓN, J.H. (2013).- Differences in body temperature, cell viability, and HSP-70 concentrations between Pelibuey

Bulletin de la Société zoologique de France 140 (2)

and Suffolk sheep under heat stress. *Trop. Anim. Health Prod.*, **45** (8), 1691-1696. DOI 10.1007/s11250-013-0416-1.

SILANIKOVE, N. (2000).- Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livest. Prod. Sci.*, **67**, 1-18.

THOM, E.C. (1959).- The Discomfort Index. *Weatherwise*, **12**, 57-59.

(reçu le 08/01/2015 ; accepté le 21/04/2015)