Université de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

PATOGEN

Présentée et soutenue par :
Cécile BONNEFONT

le : lundi 14 novembre 2011

Titre :

Analyses génomiques fonctionnelles de la résistance aux mammites :
études de deux lignées divergentes de brebis
sélectionnées sur la concentration cellulaire du lait

Ecole doctorale :
Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :
UR631 INRA SAGA / UMR1225 INRA-INPT-ENVT IHAP

Directeur(s) de Thèse :
Christèle ROBERT-GRANIE
Gilles FOUCRAS (IHAP)

Rapporteurs :

Johann DETILLEUX
Eve DEVINOY

Membre(s) du jury :
Johann DETILLEUX
Eve DEVINOY
Gilles FOUCRAS
Pascal MARTIN
Pascal RAINARD
Rachel RUPP

REMERCIEMENTS

Une thèse, c'est du travail, beaucoup de travail, mais c'est aussi des rencontres. Je voudrais remercier toutes les personnes qui ont croisé mon chemin à un moment donné et qui m'ont aidé, par leurs conseils avisés, par leurs encouragements ou par leur bonne humeur.

Mon travail de doctorat a été réalisé entre la Station d'Amélioration Génétique des Animaux (SAGA) et l'UMR Interactions Hôtes-Agents Pathogènes (IHAP). Il a été financé par les départements de génétique animale (GA) et de santé animale (SA) de l'INRA. A ce titre, je tiens à remercier Didier Boichard et Denis Milan, ancien et actuel chefs du département GA, Gilles Aumont et Thierry Pineau, ancien et actuel chefs du département SA pour avoir accepté le co-financement de ma thèse. Je remercie aussi Christèle Robert-Granié et François Schelcher, directeurs respectifs de la SAGA et de l'IHAP pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire, ainsi que toutes les personnes des deux unités pour leur convivialité.

Je remercie tous les membres du jury et particulièrement Johann Detilleux, professeur dans le groupe de Génétique Quantitative, de la faculté de mèdecine vétérinaire de l'université de Liège, pour avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse et Eve Devinoy, directrice de recherche 1 de l'unité INRA Génomique et Physiologie de la Lactation (UR1196 GPL) qui m'a fait l'honneur d'être à la fois présidente du jury et rapporteur de ma thèse. Je remercie également Pascal Martin, ingénieur de recherche 2 dans l'unité ToxAlim (UMR1331 INRA-INPT-ENVT) pour ses conseils avisés sur les analyses du transcriptome et Pascal Rainard, directeur de recherche 2 dans l'unité INRA Infectiologie Animale et Santé Publique (UR1282 IASP) pour ses réflexions sur le fonctionnement intégré des cellules de la glande mammaire lors d'infections.

Je remercie également les membres du comité de pilotage de ma thèse Pascal Martin, Philippe Mulsant, Claire Rogel-Gaillard et Magali San Cristobal pour leurs précieux conseils sur les analyses de puce à ADN et pour leurs réflexions sur mes travaux de thèse. Je remercie chaleureusement Mehdi Toufeer, ancien doctorant de l'IHAP, qui m'a bien aidé dans la réalisation des analyses de laboratoire et qui m'a permis de mener à bien l'ensemble des projets. Je remercie aussi Pascal Rainard et son équipe avec qui j'ai collaboré pour les études des cellules épithéliales mammaires.

Je suis très reconnaissante à Rachel Rupp, Gilles Foucras et Christèle Robert-Granié, qui m'ont guidé tout au long de ma thèse. Et même si leurs points de vue et leurs objectifs n'étaient pas toujours identiques, et même si j'ai parfois rencontré quelques difficultés pour trouver ma place, c'était une richesse de travailler avec eux, et petit à petit, j'ai pu tracer mon petit bout de chemin entre la génétique quantitative et l'immunologie. Rachel, Gilles et Christèle je vous remercie chaleureusement pour avoir partagé avec moi vos connaissances (scientifiques, méthodologiques, humaines), pour m'avoir orientée pendant ces trois années, et m'avoir soutenue lorsque j'en avais besoin.

Je remercie aussi le personnel des plateformes GenoToul qui m'ont aidé lors des différentes étapes, Lidwine Trouilh pour les hybridations des puces à ADN, Olivier Bouchez pour les analyses de PCR à grande échelle et Philippe Bardou de Sigenae pour le dépôt des données transcriptomiques dans GEO. Je remercie Magali San Cristobal, Laurence Liaubet,

Gwenola Tosser-Klopp, Christèle Robert-Granié et les autres membres du groupe de travail « Biopuce », ainsi que Sébastien Déjean, Pascal Martin et les autres membres du groupe de travail « Biostat » pour m'avoir formée, aidée et conseillée dans l'analyse des données transcriptomiques et toujours dans la bonne humeur.

Je remercie Guillaume Sallé, Guillaume Balloche, Simon Teyssèdre, Carole Moreno, Gwenola Tosser-Klopp et Julie Demars pour avoir partagé avec moi leurs connaissances sur les analyses de polymorphisme d'ADN et m'avoir fait bénéficier de certains de leurs outils. Je remercie aussi l'équipe d'Alessandra Stella du Parco Technolgico Padano avec qui j'ai eu l'occasion de collaborer, et principalement Bouabid Badaoui pour la méta-analyse des données transcriptomiques et Francesco Strozzi pour l'annotation de la puce à ADN ovine.

Et comme sans les brebis, je n'aurai pas eu de sujet d'étude, je voudrais remercier tout le personnel de l'unité expérimentale de La Fage qui participe à l'élevage du troupeau, et spécialement à Marie-Rose Aurel et Ophélie Duvallon ainsi que Charlotte Allain qui fait le lien entre La Fage et la SAGA. Je remercie également le personnel de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse qui s'occupe des brebis présentes sur le campus.

Je remercie aussi Cécile Caubet et Christian Tasca pour leur aide en laboratoire, Guillaume Tabouret et Séverine Boullier pour leurs discussions autour des mammites ainsi que Emmanuelle Totain et Sokunthea Top pour leur bonne humeur.

Merci au petit groupe de jeunes sagassiens que j'ai appris à connaître et avec qui j'ai partagé de très bons moments. Merci à Carine, Simon, Guigui, Julien, Hugues, Mila, Chloé, Charlotte, Momo, Cyrielle, Guillaume. Un merci spécial à Llibertat.

Et puis, il y a la vie en dehors du labo et je voudrais sincèrement remercier toutes les personnes qui gravitent dans ma petite sphère et qui me permettent d'oublier la fatigue, d'évacuer le stress et d'être heureuse. D'abord un grand merci à ma famille, à mes parents qui m'ont montré un bon modèle et qui me racontent de jolies histoires sur les petits animaux de la forêt ; à mes frérots Stéphane et Michel qui m'emmènent découvrir de super paysages en montagne en hiver comme en été ; à ma cantinière préférée du mercredi midi, j'ai nommée Domi qui, avec ma mamie et les deux petites demoiselles Noä et Ellie, me rend toujours le sourire.

Et puis un grand merci à ma famille « ultimate frisbee » à Lisou, Kaouet, Cèd, JG, Vévert, je ne peux pas tous les citer, mais un merci particulier au petit groupe des motivés du lundi soir avec le fameux « Physique – Tartiflette ». Vive les BTR !!

Merci à la joyeuse bande auzevilloise que je suis toujours ravie de retrouver quelque soit le lieu. Merci à Céline, Alice, Sarah, Pascalou, Josépha et les autres ensatiens pour tous ces bons moments.

Et puis, je finirai par un merci spécial à Ludo, qui m'a bien aidé à gérer mes coups de stress et que je remercie également pour partager ma petite vie au quotidien.

J'ai aussi une petite pensée pour ceux qui m'ont quitté pendant ces trois dernières années : Arlette, Roger et Nelly.

RESUME

Les mammites sont des inflammations de la mamelle provoquées principalement par des bactéries. Elles représentent un problème majeur en élevage car elles entraînent d'importantes pertes économiques pour les filières de ruminants laitiers. Elles sont caractérisées par de fortes augmentations de la concentration des cellules somatiques dans le lait. Le score de cellules somatiques (SCS) est très bien corrélé à la présence d'une infection mammaire. Il peut donc être utilisé en sélection pour améliorer la résistance aux mammites. Pour comprendre les mécanismes mis en place lors d'une sélection sur les SCS, deux lignées divergentes de brebis ont été produites à partir de géniteurs ayant des valeurs extrêmes de l'index SCS.

Le principal objectif de ce travail est d'identifier et de comprendre les mécanismes qui confèrent une plus grande résistance ou sensibilité aux mammites provoquées par des staphylocoques. Nos travaux ont porté principalement sur des analyses transcriptomiques de trois types cellulaires majeurs, après contact avec des staphylocoques : les cellules inflammatoires du lait recueillies après infection, qui sont principalement composées de neutrophiles, les cellules dendritiques, comme cellules présentatrices d'antigène et les cellules épithéliales mammaires, première barrière de défense et qui sont les plus nombreuses sur le site de l'infection. Nous avons montré que la migration des cellules immunitaires et les processus inflammatoires se traduisent par des activations de voies différentes chez les brebis des deux lignées divergentes. Nous avons aussi identifié des gènes fonctionnels candidats (*ahr, tp53, sc5* et *tmem87b*) pour expliquer la différence de sensibilité aux mammites. En parallèle, nous avons étudié l'association entre le polymorphisme de l'ADN et la présence d'abcès mammaires liés aux mammites dans un dispositif cas-contrôle visant à détecter des gènes à effet majeur. Les études ont permis de mettre en évidence une zone chromosomique d'intérêt située sur le chromosome OAR5.

Les deux approches de génétique moléculaire menées dans ces études, à la fois l'analyse du transcriptome et celle du polymorphisme du génome, ont permis d'identifier des gènes fonctionnels et positionnels candidats pour comprendre les mécanismes associés à la résistance aux mammites.

ABREVIATIONS

ADN : Acide Desoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARNm : Acide Ribo Nucléique messager

BLUP : Best Linear Unbiased Prediction

BMDC : Bone Marrow derived Dendritic Cells

CAEV : Arthrite Encéphalite Caprine à Virus

CCS : Concentration de cellules somatiques

CD : Cellules dendritiques

CEM : Cellules épithéliales mammaires

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CNV : Copy Number Variation, variation du nombre de copie

CR4 : Complement Receptor 4

CSF : Colony Stimulating Factor

CSL : Cellules somatiques du lait

CTIG : Centre de Traitement de l'Informatique Génétique

ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

FC : Fold-Change

FCEL : France Conseil Elevage

GMCSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

PNN : Poly-Nucléaire Neutrophile

GSEA : *Get Set Enrichment Analysis*

HKG : House Keeping Genes : gènes de ménage

IA : Insémination Artificielle

Ig : Immunoglobulines

IL : Interleukine

IMI : Infection Intra-Mammaire

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

LA : Linkage Analysis

LD : Linkage Desequilibrium

LDLA : Linkage Desquilibrium Linkage Analysis

LPS : Lipopolysaccharide

LTA : Acide Lipotéicoïque

MC : Mammite Clinique

MCSF : Macrophage Colony Stimulating Factor

MIAME : Minimum Information About a Microarray Experiment

MKK : MAPK kinase

MRSA : Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

MSC : Milk Somatic Cell, cellules somatiques du lait

NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase

NK : Natural Killer cell, cellules naturelles tueuse,

PAMP : Pattern Associated Molecular Pathogen

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell

QTL : Quantitative Trait Locus

RNAseq : séquençage d'ARN

ROS : Reactive Oxygen Specie

RT-qPCR : quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Sa : S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SAGA : Station d'Amélioration Génétique des Animaux

SAM : Sélection Assistée par Marqueurs

SCN : Staphylocoque à Coagulase Négative

SCP : Staphylocoque à Coagulase Positive

SCS : Score de cellules somatiques, Somatique Cell Score

Se : S. epidermidis : *Staphylococcus epidermidis*

SIG : Système d'Information Génétique

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

Sp : supernatant : surnageant

TAQ : *Thermophillus aquaticus*

TFBS : *Transcripion Factor Binding Site*

Th : T helper

TLR : Toll Like Receptor

TNFa : Tumor Necrosis Factor α

UE : Unité Expérimentale

SOMMAIRE

Remerciements 1
Résumé 3
Abréviations 4
Sommaire 6
Table des illustrations 10

Introduction Générale 13

Chapitre I : Les mammites des ruminants laitiers et les objectifs 17

1 Les infections intra-mammaires : définition, causes et évolution 19
1.1 Mammites cliniques et subcliniques 19
1.2 Etiologie des mammites : des causes multiples 20
1.3 Dynamique des infections : contamination et évolution clinique 22
1.4 Critères de détection des infections intra-mammaires 22
1.4.1 Le diagnostic bactériologique 22
1.4.2 La détection des cas cliniques 23
1.5 Critères indirects et dépistage des infections intra-mammaires 24
1.6 Conséquences biologiques 26

2 Les mécanismes généraux de protection contre les infections mammaires chez les ruminants laitiers 27
2.1 Les mécanismes de défense naturelle 27
2.2 Les mécanismes de défense immunitaire 28
2.2.1 Immunité innée de la glande mammaire 28
2.2.1.1 Immunité cellulaire 29
2.2.1.1.1 Récepteurs Toll-Like et défenses de la glande mammaire 29
2.2.1.1.2 Les neutrophiles 30
2.2.1.1.3 Les macrophages 33
2.2.1.1.4 Les cellules dendritiques 33
2.2.1.1.5 Les cellules naturelles tueuses 33
2.2.1.1.6 Les cellules épithéliales mammaires 34
2.2.1.2 La fraction soluble de l'immunité innée 34

2.2.1.2.1 Les peptides antimicrobiens 34
2.2.1.2.2 Le système du complément 34
2.2.2 La réponse immunitaire acquise de la glande mammaire 35
2.2.2.1 Les lymphocytes et les défenses mammaires 35
2.2.2.2 Les cellules B et les immunoglobulines 35
2.2.2.3 Le rôle des cytokines dans la glande mammaire 36
2.3 Variation du transcriptome lors d'infections mammaires 36

3 Lutte contre les mammites : des méthodes curatives et préventives 38
3.1 Méthodes de lutte classique 38
3.1.1 Des traitements curatifs : les antibiotiques 38
3.1.2 Des méthodes préventives 39
3.1.2.1 Hygiène et gestion du troupeau 39
3.1.2.2 Vaccination 39
3.2 L'amélioration génétique 40
3.2.1 Qu'est-ce que la résistance et comment la mesurer ? 40
3.2.2 Les paramètres génétiques 41
3.2.3 Génétique quantitative et sélection 44
3.2.3.1 Evaluation génétique : calcul de l'index SCS 45
3.2.3.2 Utilisation de l'index SCS dans les programmes d'amélioration génétique 45
3.2.4 Les apports de la génétique moléculaire 46
3.2.4.1 Le polymorphisme de l'ADN 46
3.2.4.2 Les QTL associés à la résistance aux mammites 47
3.2.4.3 Utilisation de l'information moléculaire 48

4 Objectifs de la thèse 50

Chapitre II : Matériels et méthodes 53

1 Un modèle d'étude original : les lignées divergentes 55
1.1 Protocole de sélection divergente 55
1.1.1 Production des brebis des lignées divergentes 55
1.1.2 Des différences de concentrations de cellules somatiques 56
1.2 Résistance aux infections intra-mammaires dans les lignées divergentes ... 56

1.2.1 Suivi d'infections naturelles 56
1.2.2 Suivi d'infections expérimentales 57

2 Analyses des différences d'origine génétique 59
2.1 L'analyse des gènes exprimés 59
2.1.1 Quelques méthodologies d'analyse 59
2.1.1.1 Quantification des ARN par réaction de polymérisation en chaîne .. 59
2.1.1.2 Quantification des ARN par puce à ADN 61
2.1.1.2.1 Nature et définitions d'ue puce à ADN 61
2.1.1.2.2 Hybridation des échantillons d'ARNm 63
2.1.1.2.3 Nettoyage et normalisation des données 64
2.1.2 Etude de la variabilité biologique dans l'expression des gènes 66
2.1.2.1 Identification de gènes différemment exprimés 67
2.1.2.1.1 Analyse de variance avec des modèles linéaires 67
2.1.2.1.2 Correction sur les tests multiples 67
2.1.2.1.3 Mesure des différences d'expression entre les conditions biologiques 68
2.1.2.1.4 Cas particulier des données de RT-qPCR 68
2.1.2.2 Interprétation des listes de gènes 69
2.1.2.2.1 Les annotations de la puce ovine Agilent 69
2.1.2.2.2 Analyses de groupes de gènes 69
2.1.2.3 Analyse d'enrichissement 73
2.1.3 Comment confirmer les résultats ? 73
2.2 Etude du polymorphisme de l'ADN 74
2.2.1 Un outil de choix pour l'étude du polymorphisme chez l'ovin : la puce SNP 54K d'Illumina 74
2.2.2 Les méthodes d'étude du polymorphisme de l'ADN 74
2.2.3 Vers l'identification des gènes et mutations causales 76

Chapitre III : Résultats et discussions partielles 79

Partie 1 : Analyse transcriptomique des cellules somatiques du lait chez des brebis de la lignée résistante et de la lignée sensible aux mammites après infection expérimentale par *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus* 81

1 Contexte et objectifs 81

2 Résumé 82

3 Article 1 83
4 Discussion 101

Partie 2 : Analyse transcriptomique des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse chez des brebis de la lignée résistante et de la lignée sensible aux mammites après stimulation *in vitro* par *Staphylococcus aureus* 105
1 Contexte et objectifs 105
2 Résumé 106
3 Article 2 107
4 Discussion 123

Partie 3 : Cellules épithéliales mammaires et résistance aux mammites : analyse transcriptomique après infection expérimentale *in vitro* par *Staphylococcus aureus* ou stimulation par son surnageant de culture 125
1 Contexte et objectifs 125
2 Résumé 125
3 Article 3 127
4 Discussion 163

Partie 4 : Méta-analyse des données transcriptomiques réalisées à partir des cellules de brebis sélectionnées sur la résistance aux mammites 165
1 Contexte et objectifs 165
2 Résumé 168
3 Article 4 171
4 Discussion 191

Partie 5 : Etude du polymorphisme de l'ADN dans les populations de brebis CCS+ et CCS- 195
1 Contexte et objectifs 195
2 Matériel et méthode 195
3 Résultats 199
4 Discussion 205

Chapitre IV : Discussion et perspectives 211

Annexes 225
Bibliographie 233

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Légende des figures

Figure 1 : Maturation des granulocytes 31

Figure 2 : Diapédèse des neutrophiles à travers la couche de cellules endothéliales ... 31

Figure 3 : Score moyen des examens cliniques des mamelles et excrétions bactériennes après inoculation de 10^3 ufc *S. epidermis* et de *S. aureus* 58

Figure 4 : Courbes de suivi de la quantité d'ADN au cours de la RT-qPCR. 60

Figure 5 : Courbes de dissociation des ADN double brin en ADN mono brin 60

Figure 6 : Histogramme du nombre de publications utilisant la technologie microarray par an depuis 1990 62

Figure 7 : Distribution des intensités de fluorescence de tous les spots d'un microarray selon la normalisation des données 65

Figure 8 : MAplot des intensités de fluorescence selon la normalisation des données de microarray 65

Figure 9 : Classification hiérarchique des gènes avec un heatmap 70

Figure 10 : Exemples de deux réseaux de gènes obtenus avec IPA 72

Figure 11 : Dénombrement des neutrophiles sanguins dans les six jours après l'inoculation intra-mammaire de *S. aureus* 102

Figure 12 : Diagramme de Venn entre les trois listes de gènes différentiels entre lignées obtenus avec les CSL, CD et CEM 167

Figure 13 : Réseau de gènes obtenu avec Ingenuity (IPA) qui regroupe les gènes différentiels dans chacune des analyses (CSL, CD et CEM) 168

Figure 14 : Nombre de SNP et espacement moyen entre deux SNP par OAR 198

Figure 15 : Significativité de tous les SNP dans l'analyse des lignées divergentes de brebis 200

Figure 16 : Significativité des SNP dans l'analyse des lignées divergentes de brebis sur les chromosomes OAR7, OAR8 et OAR10 qui contiennent au moins un SNP significatif. . 201

Figure 17 : Significativité de tous les SNP dans l'analyse binaire et catégorielle des abcès 202

Figure 18 : Significativité des SNP dans l'analyse binaire des abcès sur les chromosomes OAR1, OAR2, OAR5, OAR7, OAR8, OAR21 et OAR24 qui contiennent au moins un SNP significatif 203

Figure 19 : Significativité des SNP dans l'analyse binaire des abcès sur les chromosomes OAR5, OAR8, OAR16, OAR21 et OAR24 qui contiennent au moins un SNP significatif. 204

Figure 20 : Voies de signalisation à partir des TLR et d'autres récepteurs 215

Légende des tableaux

Tableau 1 : Réservoirs et fréquence relative des microorganismes responsables de mammites cliniques et de mammites subcliniques 21

Tableau 2 : Règles de prédiction des IMI basées sur les CCS mensuels 25

Tableau 3 : Modifications physico-chimiques du lait causées par les mammites 27

Tableau 4 : Récapitulatif des PRR et de leurs principaux ligands 29

Tableau 5 : QTL pour la résistance aux mammites chez les brebis laitières 50

Tableau 6 : Caractéristiques des brebis CCS+ et CCS- 56

Tableau 7 : Concentrations de cellules somatiques et fréquences des mammites chez les brebis CCS+ et CCS- 57

Tableau 8 : Effectifs des brebis dans chaque analyse de polymorphisme d'ADN 196

Tableau 9 : Description des SNP significatifs dans l'analyse des lignées divergentesde brebis 200

Tableau 10 : Description des animaux présents dans l'analyse binaire des abcès 201

Tableau 11 : Description des SNP significatifs dans l'analyse binaire des abcès 202

Tableau 12 : Description des animaux présents dans l'analyse catégorielle des abcès 204

Tableau 13 : Description des SNP significatifs dans l'analyse catégorielle des abcès 205

Tableau 14 : Description des SNP situés à proximité du SNP significatif sur OAR5.. 205

Tableau 15 : Fréquence génotypiques des 4 SNP situés à proximité du SNP significatif sur OAR5 dans l'analyse binaire des abcès.. 206

Tableau 16 : Fréquence génotypiques des 4 SNP situés à proximité du SNP significatif sur OAR5 dans l'analyse catégorielle des abcès. 206

Tableau 17 : Description des clusters de gènes différemment exprimés 208

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Poster WCGALP, 2010 227
Annexe 2 : poster EEAP 2011 228
Annexe 3 : Répartition des SNP sur chaque chromosome et espacement moyen 229
Annexe 4 : Liste des communications 230

INTRODUCTION GENERALE

Les mammites représentent un problème sanitaire et économique majeur en élevage de ruminants laitiers. Pour pallier leurs effets, la plupart des programmes de sélection de bovins laitiers en vigueur à travers le monde prend en compte les concentrations de cellules somatiques (CCS) et éventuellement les cas de mammites cliniques. Fin 2008, peu de données sur les effets concrets *a posteriori* d'une sélection sur les CCS étaient disponibles.

Une expérience de sélection divergente de brebis à partir des index SCS extrêmes a permis d'obtenir deux lignées avec de grandes différences phénotypiques. Les brebis avec des concentrations cellulaires du lait régulièrement plus élevées sont plus sensibles aux infections intra-mammaires (IMI) que les brebis avec des concentrations cellulaires plus faibles. Ces différences de résistance se caractérisent par des fréquences de mammites cliniques, subcliniques et d'abcès plus élevées chez les brebis de la lignée sensible que chez les brebis de la lignée résistante. Pour autant, les mécanismes mis en place lors de la sélection sur le critère CCS ne sont pas connus et il est probable que les différences génétiques entre les deux lignées soient polygéniques.

Ce travail de thèse a pour vocation d'apporter des connaissances sur le déterminisme génétique de la sélection sur les CCS et sur les mécanismes de réponse de l'hôte à une IMI, en valorisant le modèle des lignées divergentes. Les analyses se basent sur l'étude du transcriptome et du polymorphisme génétique avec des puces à ADN (appelées microarray dans le manuscrit) et des puces permettant d'identifier des polymorphismes d'un seul nucléotide (appelées puces à SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*), respectivement. Ces deux supports analytiques spécifiques à l'espèce ovine ont été développés récemment et nous ont permis d'investiguer les mécanismes ou les gènes qui expliquent les différences de résistance aux IMI entre les deux lignées de brebis.

Le Chapitre 1 établit le contexte de mes études à partir de données bibliographiques sur les mammites, en montrant pourquoi les infections intra-mammaires (IMI) sont considérées comme la première cause de maladie en élevage laitier. Ce chapitre est traité sous trois aspects : quelles sont les causes des mammites ?, quelles sont leurs conséquences ? et comment diminuer leur impact ? De nombreuses informations proviennent d'études réalisées sur la vache laitière, mais certaines spécificités de la brebis et de la chèvre laitières sont abordées. Afin de comprendre l'immunité mammaire, les principaux mécanismes immunitaires de réponse aux infections à staphylocoque chez les ruminants laitiers sont décrits brièvement. Puis les différents moyens de lutte contre les mammites sont abordés d'un point de vue curatif mais aussi préventif, en développant particulièrement l'amélioration génétique. A la fin de ce chapitre, les objectifs de mon travail de thèse sont présentés.

Le Chapitre 2 récapitule les principales informations méthodologiques nécessaires à la réalisation des expériences décrites dans ce manuscrit. Dans un premier temps, les ressources animales sont présentées afin d'établir leurs caractéristiques et de positionner les objectifs de mon travail. Puis les principaux outils et méthodes utilisés pour les analyses du polymorphisme génétique et du transcriptome sont présentés synthétiquement.

L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans le Chapitre 3 sous forme de partie. Chaque partie décrit une analyse différente et se découpe selon un modèle commun qui s'appuie sur un article en anglais (le statut de l'article, publié, soumis ou en préparation est précisé), à l'exception de la partie 5, qui est rédigée entièrement en français. L'article est précédé du contexte et des objectifs de l'expérience présentée, ainsi que d'un résumé en français des principaux résultats de chaque analyse. Il est suivi d'une discussion en français qui permet de reprendre les principales informations de l'article et de proposer de nouvelles hypothèses.

La Partie 1 traite des réponses des cellules somatiques inflammatoires du lait après inoculation de *Staphylococcus epidermidis* et de *Staphylococcus aureus* dans les deux lignées divergentes de brebis. Les Parties 2 et 3 présentent les réponses *in vitro* des cellules dendritiques et des cellules épithéliales mammaires, respectivement, après stimulation par *S. aureus*. Ces trois parties permettent d'établir des hypothèses sur les mécanismes cellulaires de réponse aux infections à *Staphylococcus* qui différencient les brebis de la lignée résistante de celles de la lignée sensible.

Ensuite, une méta-analyse de ces trois jeux de données permet de confirmer certaines hypothèses qui ont été formulées lors des analyses monocellulaires, et d'en générer de nouvelles. Elle permet aussi d'établir une liste de mécanismes et de gènes candidats fonctionnels pour déterminer l'origine génétique de la différence entre lignées. Cette synthèse est présentée dans la Partie 4.

Pour compléter l'étude génétique des lignées, des études du polymorphisme de l'ADN sur ces animaux ont été réalisées (Partie 5). Dans un premier temps, ces analyses portent sur les lignées divergentes de brebis, puis sur la formation des abcès mammaires qui symbolise des mammites chroniques. Ensuite, les résultats des analyses fonctionnelles et positionnelles sontconfrontés pour mettre en évidence les principales caractéristiques des brebis de la lignée résistante et de celles de la lignée sensible aux IMI.

Le chapitre IV récapitule brièvement l'ensemble des résultats obtenus et les compare aux données publiées sur la résistance aux mammites d'origine génétique. Puis, quelques réflexions sur le travail effectué sont apportées ainsi que des perspectives pour la poursuite de ce projet.

CHAPITRE I : LES MAMMITES DES RUMINANTS LAITIERS ET LES OBJECTIFS

Les mammites sont définies comme des conditions inflammatoires de la glande mammaire en réponse à une blessure, qui servent à détruire et neutraliser les agents infectieux et à promouvoir la guérion et le retour à un fonctionnement normal de la glande mammaire (National Mastitis Council 1996).

La fréquence des mammites cliniques est généralement comprise entre 20 et 45%, chez les bovins. Il a été montré en Norvège qu'elle avait fortement augmenté entre 1978 et 1994 (de 13% vaches infectées en première lactation vs 28%) (Heringstad et al. 1999). Chez les petits ruminants, elle est bien plus faible (de l'ordre de 5%) (Bergonier *et al.* 2003). La fréquence des mammites subcliniques est bien plus élevée : entre 47 et 53% chez les bovins en France (Fabre et al. 1997; Faye et al. 1994) et entre 15 et 55% chez les petits ruminants (Paape et Capuco 1997), mais les données varient fortement d'une étude à l'autre.

Selon, la sévérité de l'infection et le nombre d'animaux malades au sein du troupeau, les IMI peuvent provoquer de fortes pertes économiques pour les éleveurs. Ces pertes reposent sur la diminution du volume de lait produit, la dévalorisation du prix de vente du litre de lait (pénalités dans le cadre du paiement du lait à la qualité), les cas cliniques (traitements, volume de lait non commercialisé, …) et l'augmentation du taux de réforme des animaux. Au Royaume-Uni, l'ensemble des pertes liées aux mammites est estimé entre 106 et 373 millions de livres par an (Axford et al. 2000) et à 2 milliards de dollars aux Etats-Unis comme le rapporte Sordillo *et al*. (2002). Ainsi, les mammites sont classées au premier rang des maladies chez les bovins laitiers en regard de leurs conséquences économiques (Davies et al. 2009).

Ma thèse s'inscrit dans le cadre des mammites et elle a pour but de mieux comprendre les IMI. Dans ce premier chapitre, les mammites sont présentées à travers leurs causes, leurs conséquences et les méthodes qui permettent de les diagnostiquer. Ensuite, les mécanismes généraux de défense contre les IMI à des niveaux physiologiques, puis immunitaires sont présentés. Une synthèse bibliographique sur les mécanismes fins de réponse aux IMI est établie en se basant sur les analyses transcriptomiques qui ont été réalisées à la suite d'infection par des agents responsables de mammites. A la fin de ce chapitre, les méthodes de lutte contre les mammites sont présentées avec d'un côté les méthodes classiques (préventives et curatives) réalisées en élevage et de l'autre l'amélioration génétique en détaillant les paramètres génétiques des critères utilisés et la sélection sur ces critères.

1 Les infections intra-mammaires : définition, causes et évolution

1.1 Mammites cliniques et subcliniques

Les IMI sont provoquées par la pénétration d'un microorganisme dans la glande mammaire par le canal du trayon. Selon sa sévérité, on différencie la **mammite clinique** (entraînant une modification systématique de l'aspect du lait), de la **mammite subclinique** que l'on met en évidence *a posteriori*, grâce à une bactériologie du lait et à l'identification d'un recrutement cellulaire. Parfois les germes s'installent de façon durable dans la glande mammaire, on parle alors de **mammites chroniques**.

Différents symptômes peuvent avoir lieu lors d'une mammite clinique. Premièrement des symptômes locaux peuvent apparaître i) au niveau de la glande mammaire avec un gonflement de la mamelle, souvent accompagné de douleurs, une augmentation de la température et parfois une congestion (couleur rougeâtre) et ii) au niveau du lait avec la

formation de grumeaux, parfois accompagnés de liquide séro-hémorragique (mélange de sérum et de sang), voire de pus. Dans les cas les plus graves, des symptômes généraux apparaissent, ils sont dus à la libération d'IL1β, IL6 et TNFa qui agissent sur le foie et le système nerveux central. Le foie peut alors sécréter des protéines de la phase aiguë et le système nerveux central peut provoquer de la fièvre. Cette élévation de la température corporelle est généralement accompagnée d'une accélération du rythme cardiaque et du rythme respiratoire.

1.2 Etiologie des mammites : des causes multiples

Les mammites sont provoquées par plus d'une centaine de microorganismes (Rinaldi et al. 2010; Watts 1988). Elles sont presque exclusivement d'origine infectieuse. Elles sont souvent liées à des traumatismes ou des agressions de la peau du trayon ou au niveau de la mamelle et parfois à des sténoses du canal du trayon (lésions liées à la machine à traire). Elles sont essentiellement provoquées par des **bactéries** et beaucoup plus rarement par des levures, champignons, parasites ou virus. Une mamelle saine est considérée comme stérile ; elle n'héberge donc pas de flore « normale ».

Les bactéries pathogènes peuvent être classées selon la **gravité des infections** qu'elles occasionnent (Tableau 1). Les bactéries responsables de mammites sévères sont qualifiées de **pathogènes majeurs**. Dans cette catégorie, on regroupe habituellement les staphylocoques à coagulase positive (SCP dont *Staphylococcus aureus*), les streptocoques, les entérobactéries (dont *Escherichia coli*) et les entérocoques. Parmi ces pathogènes, certains provoquent fréquemment des épisodes cliniques suraigus ou aigus (entérobactéries et *Streptococcus uberis*) alors que d'autres (comme *S. aureus*) sont surtout responsables de mammites chroniques. On qualifie de **pathogènes mineurs** les microorganismes qui produisent des infections modérées, principalement de type subclinique. Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) et *Corynebacterium bovis* en sont les principaux représentants.

Les agents pathogènes peuvent également être distingués en fonction de leur **principal réservoir** (Tableau 1). Les staphylocoques, *Streptoccocus agalactiae* et *Streptococcus* dysgalactiae sont présents préférentiellement dans la **mamelle** et sur la peau des trayons alors que les entérobactéries et les entérocoques se situent préférentiellement dans l'**environnement** (litière, fourrage, air). D'autres germes, comme *Streptococcus uberis*, peuvent occuper les deux niches.

Des virus peuvent être impliqués dans le déclenchement des mammites, soit en causant des lésions du trayon et ainsi en favorisant la contamination par d'autres pathogènes, soit en ayant une action immunosuppressive (Barkema et al. 2009; Wellenberg et al. 2002).

Tableau 1 : Réservoirs et fréquence relative des microorganismes responsables de mammites cliniques et de mammites subcliniques (d'après Poutrel 1985, Bergonier et al. 1997)

	Staphylococcus aureus	*Streptococccus agalactiae*	*Streptococccus dysgalactiae*	*Streptococccus uberis*	Entérobactéries Entérocoques (1)	*Staphylocoques à goagulase négative*	*Coryné-bactéries*
Réservoir principal	Mamelle/trayon	Mamelle/trayon	Mamelle/trayon	Mixte	Environnement	Mamelle/trayon	Environnement
Mammites cliniques							
Bovins	+	+++	+++	+++	++	--	--
Ovins	+++	-	-	+/-	--	++	--
Caprins	+++	-	-	-	--	++	--
Mammites subcliniques							
Bovins	+++	++	++	++	-	++	-
Ovins	++	-	-	-	--	+++	--
Caprins	++	-	-	-	--	+++	--

(1) Entérobactéries = *Escherichia coli, Klebsiella sp., Proteus ... ;*
Entérocoques = *Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium*

Néanmoins, l'étiologie des mammites présente des **particularités selon l'espèce** animale. Les SCN, considérés comme des agents pathogènes mineurs chez la vache, ont un rôle avéré et non négligeable chez les petits ruminants (de Clermont 1992; Seegers et al. 1997; Bergonier et al. 1997; Rupp et al. 2009) (Tableau 1). Lors de mammites cliniques, les streptocoques, entérobactéries et *S. aureus* sont prédominants chez la vache, alors que chez les petits ruminants les SCN et *S. aureus* sont plus fréquents (Tableau 1). Lors de mammites subcliniques, les staphylocoques (*S. aureus* et SCN) sont présents chez les trois espèces de ruminants, alors que les streptocoques sont essentiellement retrouvés chez la vache (de Clermont 1992; Seegers et al. 1997; Bergonier et al. 1997; Rupp et al. 2009). Chez les petits ruminants, les mycoplasmes occupent une place non négligeable et peuvent être responsables de mammites chroniques asymptomatiques ou de mammites sévères se traduisant par une agalactie totale (de Clermont 1992). Le virus de l'arthrite encéphalique caprine (CAEV) est impliqué dans les mammites subcliniques et parfois dans des formes cliniques avec une forte induration du tissu mammaire (de Clermont 1992; Lerondelle et al. 1992).

Comme *S. aureus* et les SCN sont les principaux agents pathogènes responsables de mammites chez les brebis, nous concentrerons nos études sur les *Staphylococci* et principalement à *S. aureus*. Pour mieux comprendre les mécanismes de réponse aux IMI, il est important de considérer la dynamique d'infection des hôtes.

1.3 Dynamique des infections : contamination et évolution clinique

Les agents pathogènes pénètrent dans la mamelle par le canal du trayon, les infections bactériennes par voie endogène (hématophore) étant exceptionnelles. Puis ils se dépacent du trayon vers les alvéoles de la citerne mammaire où le lait est synthétisé (Rinaldi et al. 2010).

L'évolution de l'infection dépend de l'espèce pathogène et de ses facteurs de virulence (Harmon 1994; Pearson et Mackie 1979), de la gestion du troupeau par l'éleveur, ainsi que de l'efficacité des défenses de l'animal (Burton et Erskine 2003). Ainsi, trois issues sont possibles : i) la guérison spontanée, mais elle est peu fréquente, ii) la persistance de l'infection traduisant un équilibre entre la multiplication du microorganisme et les défenses de l'animal et iii) l'évolution défavorable de l'infection pouvant aboutir à la perte complète ou partielle de fonctionnalité de la glande, et dans les cas extrêmes, à la mort de l'animal.

Par ailleurs, les mammites présentent un caractère évolutif. Une mammite subclinique peut évoluer en forme clinique, chronique ou aigüe, et inversement (Poutrel 1985; de Clermont 1992).

Ainsi les IMI débutent dans le trayon puis se propagent dans la glande mammaire où elles peuvent prendre différentes formes. Pour lutter contre les IMI, la première étape est de pouvoir les diagnostiquer.

1.4 Critères de détection des infections intra-mammaires

Les IMI peuvent être détectées soit par un diagnostic bactériologique du lait qui permet l'identification d'un pathogène, soit par l'observation des signes cliniques.

1.4.1 Le diagnostic bactériologique

Le diagnostic bactériologique consiste à mettre en culture des échantillons de lait dans un milieu contrôlé pour faire des clones de l'agent pathogène. Ces clones sont soumis à

différents tests afin de les caractériser. Actuellement, des méthodes de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ou de pyroséquençage permettent d'identifier l'espèce du pathogène. Les analyses bactériologiques peuvent être complétées avec d'autres méthodes qui permettent de dénombrer les agents pathogènes et peuvent apporter des éléments d'information sur le niveau de contamination d'un animal.

Un suivi régulier des quatre quartiers ou des deux hémi-mamelles (au moins une fois par mois (Miller 1984)) permet un bon suivi de l'évolution de l'infection. La détection répétée d'un même pathogène chez une vache marque la présence d'une infection chronique. L'alternance de bactériologie négative, positive et négative, révèle la présence d'un épisode infectieux qui a été résolu. Des bactériologies répétées négatives, alors que l'animal est exposé à des agents pathogènes, signent la présence d'un animal résistant.

Le diagnostic bactériologique répété de toutes les mamelles est considéré comme la meilleure mesure de détection des IMI (Miller 1984), car il permet de détecter les mammites cliniques, les mammites subcliniques et d'identifier l'agent pathogène responsable. Si le diagnostic bactériologique est réalisé peu de temps après le prélèvement, le vétérinaire peut adapter le traitement des animaux malades spécifiquement contre l'agent pathogène identifié.

Toutefois, si les intervalles de temps sont trop longs entre deux prélèvements, des résultats négatifs peuvent cacher des épisodes infectieux de courte durée. Il peut exister quelques biais à cette méthode liés à des erreurs d'identification de germe. Le diagnostic bactériologique est habituellement effectué dans des laboratoires agréés, ce qui requiert une logistique de prélèvement et de transport des échantillons et entraîne un coût non négligeable (environ 12-15 € / échantillon). Il est donc difficile d'envisager un diagnostic bactériologique des ruminants en routine (Pyorala 2003).

1.4.2 La détection des cas cliniques

Les mammites cliniques peuvent aussi être diagnostiquées directement par l'éleveur soit par l'observation et/ou la palpation de la mamelle (gonflement, rougeur, durcissement,…), soit par l'observation des premiers jets de lait avant la traite (grumeaux). Mais les symptômes varient d'un animal à l'autre et selon l'intensité de l'infection.

Elles ont l'avantage d'être détectées rapidement, ainsi les animaux malades peuvent être isolés du troupeau au moment de la traite et ils peuvent recevoir un traitement aussitôt. Mais leur diagnostic ne permet pas d'identifier l'agent pathogène en cause (même si des hypothèses peuvent être formulées). Cependant les examens cliniques du tissu mammaire et du lait ne permettent pas de détecter les mammites subcliniques qui, par définition, ne se traduisent pas par des signes cliniques, mais uniquement par la présence de germes.

Les mammites cliniques des vaches sont enregistrées dans les pays scandinaves à grande échelle depuis les années 1980. Dans ces pays, tous les cas traités sont enregistrés de façon systématique par les vétérinaires fonctionnaires et l'information est centralisée dans d'importants recueils de données, ce qui permet d'avoir une bonne qualité des données enregistrées. En France, les données sont enregistrées via les éleveurs qui notent sur leur cahier de suivi d'élevage les cas de mammites apparus, puis un technicien de France conseil élevage (FCEL) enregistre ces informations et les fait remonter vers le Système d'Information Génétique (SIG). Mais le recueil des informations directement par les éleveurs pose des problèmes de standardisation de l'identification d'un cas de mammite.

Chez les petits ruminants, les symptômes cliniques locaux peuvent être observés relativement facilement (Bergonier et al. 1997), compte tenu du moindre volume de la

mamelle et de la facilité de la palpation. Les mammites cliniques chroniques, caractérisées par des lésions et des abcès mammaires, peuvent donc également faire l'objet d'enregistrements (Bergonier et al. 1997). Depuis quelques années, les réformes causées par des mammites sont enregistrées dans la base de données ovine nationale laitière (SIEOL).

1.5 Critères indirects et dépistage des infections intra-mammaires

Contrairement aux méthodes directes, les méthodes indirectes ne permettent qu'une prédiction de l'infection, sans identification de l'agent pathogène, mais elles ont souvent l'avantage d'être mises en œuvre plus facilement.

Le principal critère indirect de détection des mammites repose sur les **concentrations de cellules somatiques** du lait (**CCS**).

Chez les ruminants laitiers, en absence d'IMI, les valeurs des CCS sont faibles. Même si les valeurs observées varient selon les études, elles sont généralement inférieures à 100 000 ou 300 000 cellules/ml chez la vache (Serieys 1985a; Harmon 1994; Laevens et al. 1997), inférieures à 100 000, 150 000 ou 300 000 cellules/ml chez la brebis (Morgante et al. 1996; Bergonier et al. 1994; Gonzalez-Rodriguez et al. 1995) et inférieures à 750 000 cellules/l chez la chèvre (de Crémoux et al. 1994; de Crémoux et al. 1996). Toutefois, la composition des cellules somatiques du lait dans une mamelle saine varie fortement selon l'espèce animale, les chèvres ayant une forte proportion de cellules épithéliales mammaires (CEM) en relation avec la production apocrine de lait.

En cas d'infection, un afflux massif de neutrophiles du sang vers la mamelle entraîne une élévation importante de la concentration de cellules somatiques (CCS) dans le lait, chez la vache (Serieys 1985b), la brebis (Morgante et al. 1996) et la chèvre (de Clermont 1992). La CCS du lait peut être considérée comme une estimation de la concentration en neutrophiles du lait et donc comme une caractérisation de l'état inflammatoire de la mamelle (Bergonier et al. 2003; Schukken et al. 2009).

L'intensité de la réponse cellulaire est très variable selon l'agent pathogène impliqué et les capacités de défense de l'animal. En général, les infections provoquées par des agents pathogènes majeurs s'accompagnent d'une élévation des CCS plus importante que celles provoquées par des agents pathogènes mineurs (Serieys 1985b; Schepers et al. 1997). En cas de mammites cliniques, les CCS peuvent atteindre plusieurs millions de cellules par ml (Pyorala et Pyorala 1997). Outre l'amplitude, la durée et l'évolution de la réaction cellulaire peuvent varier considérablement (Harmon 1994) en fonction du pathogène (Riollet et al. 1999) et de l'issue de l'infection (persistance, auto-guérison, guérison après traitement …). Ainsi, l'utilisation de valeurs ponctuelles de CCS pour distinguer de façon instantanée les animaux sains des animaux infectés apparaît peu adéquate (Reneau 1986; Bergonier et al. 1997). Il est plus pertinent d'observer les CCS sur une période plus longue. En pratique, en France, des règles de décision ont été proposées pour les trois espèces. Elles reposent sur des CCS mesurés mensuellement sur l'ensemble de la lactation (Tableau 2). Elles constituent un bon outil de dépistage des IMI chroniques et durables (Bergonier et al. 1997). Cependant, elles ne permettent pas toujours de détecter les faibles infections ou les mammites cliniques aigües de courte durée.

Outre le statut infectieux de la mamelle, d'autres paramètres peuvent influencer les CCS chez un animal sain. Les CCS sont généralement plus élevés en début et en fin de lactation (Serieys 1985b; de Clermont 1992; Lagriffoul et al. 1996), de part des modifications

physiologiques en début de lactation et une dilution dans un volume de lait plus petit en fin de lactation. Elles sont plus faibles lors de la traite du matin que lors de celle du soir, car l'intervalle entre deux traites est plus long, ainsi les cellules sont diluées dans un volume de lait plus important (Reneau 1986; Harmon 1994; Bergonier et al. 1994; de Clermont 1992). Néanmoins, le statut bactériologique reste le facteur prépondérant de variation des CCS (Harmon 1994; Bergonier et al. 1997).

Les CCS sont souvent mesurées à partir d'un échantillon de lait provenant de l'ensemble des mamelles de l'animal. Elles reflètent alors la moyenne des CCS de chaque mamelle, ce qui diminue le pouvoir prédictif de la mesure.

Les CCS sont souvent mesurées par une méthode directe automatique fluoro-opto-électronique, basée sur le comptage des noyaux cellulaires dont l'ADN est rendu phosphorescent (appareil Fossomatic, société Foss Electric). Le calibrage des appareils garantit une fiabilité des résultats de CCS dans une gamme allant de 0 à 1 800 000 cellules/ml (Lerray 1999). Le coût d'une mesure est relativement faible (entre 0,5 à 2 € / échantillon). Les CCS sont généralement mesurées dans le cadre du contrôle laitier officiel. Les échantillons de lait prélevés par les techniciens du FCEL sont transmis aux laboratoires d'analyses agréés qui réalisent les mesures et transmettent l'information aux Centres Régionaux d'Information. L'information est ensuite centralisée dans la base de données génétique nationale (CTIG, Centre de Traitement de l'Information Génétique, Jouy en Josas).

Tableau 2 : Règles de prédiction des IMI basées sur les CCS (* 1000 cellules/ml) mensuels

Espèce (Source) Règles de décision	Conclusion à l'animal
Vache (Serieys, 1985c)	
* Tous les CCS < 300	"non infecté durablement par un pathogène majeur"
* Au moins 2 CCS > 300 dont au moins 1 > 800	"infecté durablement par un pathogène majeur"
* Autres cas	aucune conclusion possible
Brebis (Bergonier et al, 1997)	
* Tous les CCS, sauf 1, < 400-500	"sain"
* Au moins 3 CCS > 800-1000	"infecté"
* Autres cas	"douteux"
Chèvre (de Crémoux, et al, 1994)	
* Au moins 2 CCS > 750	"infecté par un SCN" vs "sain"
* Au moins 2 ou 3 CCS > 1750	"infecté par un pathogène majeur"

Il existe principalement un second critère indirect de mesure des IMI. Celui-ci repose sur la **conductivité électrique** du lait (Fernando et al. 1982). Elle permet de mesurer les changements de concentration ionique du lait lors d'une inflammation. Elle a l'avantage de pouvoir être utilisée directement dans la salle de traite si l'appareil de traite est équipé de sondes. Elle permet de détecter 80% des mammites cliniques et 45% des mammites subcliniques (Norberg et al. 2004). Mais elle est extrêmement variable d'un animal à l'autre, ce qui limite son efficacité dans la détection des IMI au sein d'un troupeau (Hamann et Zecconi 1998). En revanche, la comparaison de la conductivité électrique entre les mamelles d'un même animal permet une bonne détection des compartiments atteints (Nielen et al. 1992; Jensen et Knudsen 1991; Pyorala 2003). Ainsi, chez la vache, qui possède quatre quartiers, l'utilisation de la conductivité électrique du lait est meilleure que chez les petits ruminants, qui ne possèdent que deux hémi-mamelles.

En résumé, il existe différents paramètres qui permettent de mesurer ou de prédire l'état infectieux de la mamelle. Chez les petits ruminants, les fréquences de cas cliniques étant faibles, les bactériologies coûteuses et les conductivités électriques difficiles à interpréter, le principal critère pour la prédiction des IMI est la mesure des CCS.

1.6 Conséquences biologiques

Les IMI qui sont le résultat de l'entrée de germes pathogènes dans la glande mammaire ont des répercussions sur la santé de la mamelle et celle de l'animal entier, ainsi que sur ses capacités de production.

Les processus inflammatoires accompagnés du recrutement de nombreux neutrophiles contribuent à augmenter la perméabilité vasculaire et tissulaire de la glande (Le Roux et al. 2003). Cette perméabilité accrue favorise le passage d'éléments d'origine sanguine dans le lait et entraîne des modifications profondes du fonctionnement de la glande mammaire.

L'augmentation des CCS s'accompagne d'une diminution de la concentration de lactose (Le Roux et al. 1995; Bansal et al. 2005; Ogola et al. 2007) et des transporteurs du glucose, des acides gras et de la L-carnitine (Ling et Alcorn 2010). Ces deux mécanismes conduisent à la diminution de la synthèse du lait. Ils peuvent s'expliquer par une moindre disponibilité des substrats et par la présence de bactéries sécrétant des toxines, qui ont la capacité d'altérer l'épithélium sécrétoire. La forte migration des neutrophiles du sang vers le lait semble également altérer l'épithélium sécrétoire (Paape et al. 1999). Ainsi les IMI sont responsables de la baisse de production laitière. Toutefois, chez la vache, un accroissement de la production laitière a été observé dans les quartiers sains compensant complètement ou partiellement la baisse de production du quartier infecté (Paapen et al 1999).

Les IMI sont aussi responsables d'une forte diminution de la concentration en protéines solubles (Bansal et al. 2005; Ogola et al. 2007) (Tableau 3), alors que la concentration en protéines totales augmente (Le Roux et al. 1995; Ogola et al. 2007). Cette augmentation est liée à l'augmentation de l'activité des plasmines (Le Roux et al. 1995), qui sont des protéinases impliqués dans les ruptures des caséines ; d'où la diminution de la teneur en caséine (Ogola et al. 2007).

Les IMI entraînent aussi la diminution de la concentration en matières grasses qui s'accompagne d'une augmentation de la teneur en acides gras libres (Ogola et al. 2007; Bansal et al. 2005) (Tableau 3). Cette observation peut s'expliquer à la fois par une augmentation de la quantité de lipases dans le lait (provenant des leucocytes endommagés) mais également par l'arrivée d'activateurs venant du sang (Serieys et al. 1987).

Les IMI sont responsables d'une augmentation de la quantité d'enzymes qui peuvent être impliquées dans les défenses contre l'infection (lysozymes, catalase) ou être un témoin de la destruction cellulaire (N-Acétyl-Glucosaminidase ou NAGase) (Welbeck et al. 2011).

La composition du lait en minéraux est également modifiée. Les teneurs en potassium, calcium et phosphore diminuent (Ogola et al. 2007) (Tableau 3). Pour le calcium et le phosphore, cela pourrait s'expliquer par une diminution des constituants auxquels ils sont complexés, comme la caséine. En revanche la teneur en chlore et en sodium d'origine sanguine augmente (Ogola et al. 2007) (Tableau 3). Globalement, le bouleversement des équilibres minéraux se traduit par une augmentation du pH du lait qui se rapproche de celui du plasma.

Toutefois, une étude a montré que les CCS n'affectent pas les capacités de transformation du lait en fromage, chez la chèvre (Raynal-Ljutovac et al. 2005). Des études sont en cours à la SAGA pour vérifier cette hypothèse.

Tableau 3 : Modifications physico-chimiques du lait causées par les mammites (revue de Serieys 1995)

Caractères physico-chimiques		Evolution
Lactose		↓
Matières protéiques	Taux protéique	=
	% protéines coagulables	↓
	% protéines solubles	↑
	Protéolyse par la plasmine	↑
Matières grasses	Taux butyreux	= ou ↓
	Acides gras libres	↑
Matières minérales	Potassium Calcium Phosphore	↓
	Sodium Chlore	↑
	pH	↑

2 Les mécanismes généraux de protection contre les infections mammaires chez les ruminants laitiers

Pour répondre aux IMI, les organismes ont mis en place des mécanismes qui permettent d'empêcher les bactéries de pénétrer dans la glande mammaire (défense naturelle), ou si elles sont entrées de les détecter et de les détruire (défenses immunitaires). Ces derniers mécanismes immunitaires reposent principalement sur l'immunité innée et l'immunité adaptative qui collaborent dans l'élimination des germes. Ces mécanismes sont présentés dans cette section.

2.1 Les mécanismes de défense naturelle

La mamelle est fortement soutenue par des ligaments permettant de maintenir les trayons verticaux et empêchant un abaissement du plancher de la mamelle qui risquerait d'être souillée plus fréquemment. La compartimentation des mamelles en quatre quartiers chez la vache et deux hémi-mamelles chez les petits ruminants permet de limiter la diffusion de l'infection d'un compartiment à l'autre.

Le principal point d'entrée des agents pathogènes dans la mamelle est le **trayon** et principalement son apex, où débouche le **canal** qui conduit à la citerne mammaire. Lors de la traite, le canal s'ouvre et peut atteindre 2mm de diamètre, puis il se referme grâce au **sphincter** musculaire dans les deux heures suivant la traite. Ainsi, le sphincter empêche la pénétration des bactéries. Hors lactation, un bouchon de kératine se forme à l'extrémité inférieure du canal du trayon et permet une étanchéité totale au bout d'une semaine environ chez la vache laitière (Paulrud 2005). La **peau** qui recouvre le trayon est aussi un point critique de pénétration des agents pathogènes. Elle est glabre et dépourvue de glandes sudoripares, sébacées ou muqueuses, ce qui la rend très sensible aux conditions extérieures

(température et hygrométrie). Une diminution de son élasticité entraîne souvent des lésions de l'épiderme lors de la traite, qui sont facilement colonisables par des germes.

Toutefois la structure du trayon lui confère un rôle majeur de barrière physique et chimique (Capuco et al. 1992). La partie interne du canal du trayon est tapissée de cellules squameuses qui forment un épithélium stratifié recouvert de kératine (Paulrud 2005). La kératine par sa structure retient les bactéries et empêche leur migration vers les structures plus profondes. Elle permet l'expulsion des bactéries au moment de la traite et elle contient des substances bactériostatiques (acides gras et protéines) (Craven et Williams 1985). A l'extrémité intérieure du canal se trouve la rosette de Fürstenberg qui forme un repli muqueux qui sert de point d'entrée et d'activation des leucocytes. Ainsi, le canal du trayon est un site clé, pour limiter la pénétration des agents pathogènes dans la glande mammaire.

2.2 Les mécanismes de défense immunitaire

Ce paragraphe décrit les mécanismes de défense qui sont mis en place lorsque les mécanismes de défense naturelle ont été insuffisants et qu'un germe a franchi la barrière du canal du trayon.

En général, les défenses immunitaires sont divisées en deux catégories : l'immunité innée et l'immunité acquise. L'immunité innée (qualifiée aussi de réponse non-spécifique) est le mécanisme de défense prédominant dans la glande mammaire infectée. L'immunité adaptative passe par une reconnaissance des antigènes spécifiques d'un pathogène.

Dans la glande mammaire qui est soumise à de nombreux stress, les effecteurs de l'immunité innée, de l'immunité adaptative collaborent pour fournir une protection optimale de la glande mammaire et une élimination efficace des agents pathogènes responsables de mammites.

2.2.1 Immunité innée de la glande mammaire

L'immunité innée de la glande mammaire est composée à la fois d'éléments cellulaires et humoraux qui reconnaissent spécifiquement des molécules d'agents pathogènes. Le système immunitaire inné a trois effecteurs : le **système du complément**, les **cellules phagocytaires** et les **peptides antimicrobiens** (Rooijakkers et al. 2005). Le système immunitaire inné reconnaît les antigènes étrangers, tels que les PAMP (*pathogen-associated molecular patterns, PAMP*) qui sont des molécules conservées entre espèces de microorganismes (Janeway et Medzhitov 2002). Cette reconnaissance passe par les **récepteurs PRR** (*pattern recognition receptors*), tels que les récepteurs Toll-like (*toll-like receptor,* TLR) (Vivier et Malissen 2005), ceux du complément (CLR) et d'autres récepteurs. L'immunité cellulaire innée s'articule autour des cellules phagocytaires (neutrophiles et macrophages) et des cellules naturelles tueuses (*natural killer* NK) alors que l'immunité innée humorale repose sur le système du complément, les défensines, les peptides antimicrobiens et diverses substances aux propriétés bactéricides ou bactériostatiques tels que l'oxyde nitrique, la lactoferrine, le lysozyme, la lactoperoxydase et la xanthine oxydase (Goldammer et al. 2004;Rainard et Riollet 2006; Kadowaki et al. 2001).

2.2.1.1 Immunité cellulaire

Les macrophages, les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les cellules T représentent les populations cellulaires de la glande mammaire saine. Ces cellules sont aussi appelées des cellules somatiques par opposition aux germes exogènes. Il existe une corrélation indirecte entre les concentrations de cellules somatiques dans le lait et le niveau de protection contre la plupart des agents pathogènes provoquant des mammites (Schukken et al. 1994).

2.2.1.1.1 Récepteurs Toll-Like et défenses de la glande mammaire

La détection de la présence de bactéries dans le canal du trayon est la toute première étape d'initiation de la réponse de la glande mammaire. La présence d'agents pathogènes peut être détectée dès que le processus d'infection commence grâce aux récepteurs du système immunitaire, comme les TLR. Ces récepteurs sont exprimés à la surface d'un grand nombre de cellules de la glande mammaire (macrophages, monocytes, cellules épithéliales et neutrophiles). Ils sont impliqués dans la reconnaissance de certains PAMP. Une fois détectés, les PAMP entraînent l'activation des gènes de défense (Goldammer et al. 2004).

Tableau 4 : Récapitulatif des PRR et de leurs principaux ligands d'après Werling et Coffey 2007; Chang et al. 2009; Jungi et al. 2010; Beutler 2004

Groupe	**Membres**	**Ligands connus**
Famille des MMR	MMR	HIV, *Mycobacterium tuberculosis, Candida albicans*
	DEC205	Unknown
Collectins	MBL	HIV, *Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, C. albicans, Aspergillus fumigatus*
	SP-A	RSV, HSV-1, *S. aureus, S. pneumoniae*
	SP-D	RSV, *M.tuberculosis, C. albicans, A. fumigatus, Pseudomonas aerogonosa*
C-type lectin R	DC-SIGN	HIV, HCV, Dengue, *M. tuberculosis, A. fumigatus, C. albicans,*
	Dectin-1	*Pneumocystis, C. albicans*
Famille des TLR	TLR1-10 TLR2 TLR4 TLR5-TLR9	Peptidoglycane et acide lipotéichoïque (LTA) des bactéries Gram + Lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram - Flagelline chez *E. coli*
	LBP CD14	LPS-binding protein (LBP) LPS en présence de LBP
	récepteur à FMLP	peptides fMet-Leu
Famille des NOD	NOD1 NO D2	molécules bactériennes avec D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid (iE-DAP)
Complément	C3b properdin	surface cellulaire des bactéries aide au fonctionnement de C3b

Actuellement, onze TLR ont été décrits chez l'homme et la souris ; chaque TLR a la capacité de reconnaître différents composés microbiens. Chez le mouton, dix TLR ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui (Chang et al. 2009). Par exemple, les principaux ligands de TLR2 sont les peptidoglycanes et l'acide lipotéicoïque (LTA) des bactéries Gram (+) (Takeuchi et al. 1999; Supajatura et al. 2002), alors que TLR4 reconnaît principalement les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram (-) (Miller et al. 2005). Lors d'une mammite à *S. aureus* ou *E. coli*, les gènes codant pour TLR2 et TLR4 sont exprimés (Goldammer et al. 2004; Kadowaki et al. 2001; Burton et Erskine 2003). Leur activation est suivie d'une transduction du signal par modification de cascades de gènes notamment au travers de la voie des MAPK (*mitogen activated protein kinase*) (Baranova et al. 2008). Ceci conduit à l'activation des facteurs nucléaires NFκB (N*uclear Factor-kappa b*) et AP-1 (*Activated Protein-1*) qui déclenche l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires et permet la communication entre cellules immunitaires. Outre les TLR, il existe d'autres récepteurs de l'immunité innée à la surface des cellules impliqués dans la reconnaissance des agents pathogènes. Ils sont brièvement décrits dans le Tableau 4.

2.2.1.1.2 Les neutrophiles

Principales caractéristiques des neutrophiles

Les PNN constituent une des premières barrières de défense cellulaire contre la colonisation de la glande mammaire par des bactéries (Paape et al. 2000). La capacité de ces cellules à réagir aux stimuli inflammatoires dépend de leur aptitude à la chimiotaxie, à la phagocytose et à la destruction des composés intracellulaires par des mécanismes dépendant de l'oxygène (Paape et al. 2002). La caractéristique principale des PNN est la présence d'un noyau plurilobé, qui permet aux PNN de s'insinuer plus rapidement entre les cellules endothéliales. En général, la différenciation des PNN dure de 10 à 14 jours (Bainton et al. 1971). Une fois mâtures, les PNN peuvent être stockés quelques jours supplémentaires dans la moelle osseuse. Les PNN mâtures quittent le compartiment hématopoïétique de la moelle osseuse et entrent dans le sinus vasculaire en se déplaçant dans des canaux de migration entre la couche de cellules endothéliales (Figure 1). Les PNN circulent brièvement dans le système circulatoire (demi-vie de 8,9 heures) (Carlson et Kaneko 1973). En réponse à un signal chimiotactique, les PNN quittent le sang par diapédèse entre les cellules endothéliales et pénètrent dans les tissus. Là, ils agissent comme des cellules phagocytaires pendant 1 à 2 jours. Chez l'homme, la présence de produits bactériens comme le LPS augmente la durée de vie des PNN (Lee et al. 1993).

Lors d'une mammite provoquée par *E. coli*, la déplétion de l'ensemble des PNN circulants provoque des changements dans la proportion de cellules pro génitrices de la moelle osseuse (Diez-Fraile et al. 2004). Le nombre de PNN circulants avant l'infection mammaire est crucial pour l'issue de cette infection (Heyneman et al. 1990). Plus la quantité de PNN est élevée dans le sang, plus les PNN seront recrutés précocement sur le lieu de l'infection et plus les bactéries seront éliminées rapidement avant que leur développement ne dépasse les capacités de contrôle de l'organisme.

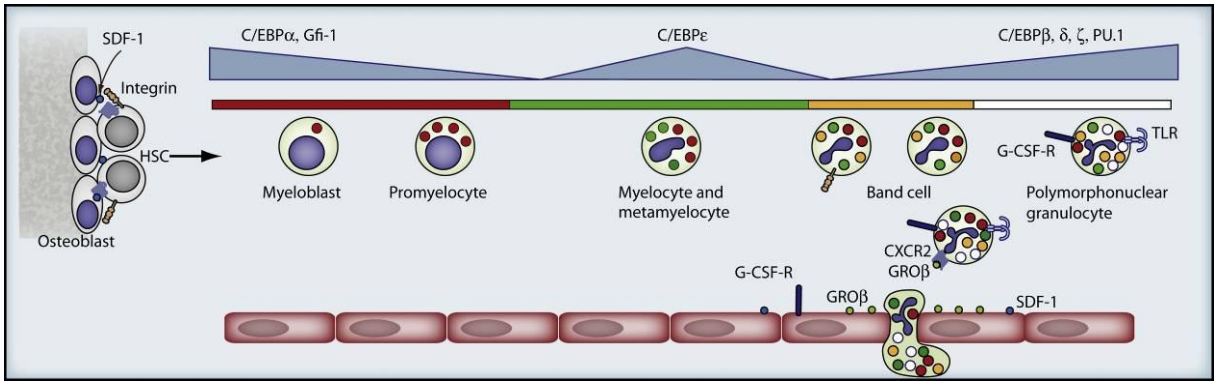


Figure 1 : Maturation des granulocytes (Borregaard 2010)

La migration des neutrophiles du sang vers le tissu mammaire

Les PNN sont les premières cellules recrutées dans le lait lorsque des agents pathogènes pénètrent dans la glande mammaire et ils représentent le type cellulaire dominant dans le lait en cas d'infection (Paape et al. 2000; Sordillo et Streicher 2002). Les PNN possèdent plusieurs récepteurs à leur surface, qui leur permettent de reconnaître des antigènes. La reconnaissance d'un antigène déclenche des processus de migration dirigée depuis le sang vers le compartiment infecté (**diapédèse)**. Tout d'abord, les L-sélectines des PNN sanguins reconnaissent leurs ligands situés à la surface des cellules endothéliales (Kishimoto et al. 1989). Les PNN ralentissent et, roulent le long de l'endothélium. Puis, les intégrines β2 des PNN (CD11a, b, et c et CD18) adhèrent aux cellules endothéliales. Les lobes du noyau sont réorganisés dans les cellules et les PNN se faufilent entre les cellules endothéliales, puis les cellules épithéliales mammaires (Figure 2). Les PNN migrent en réponse à un gradient de concentration de molécules chimio-attractantes, dont les composés du complément C3a et C5a, certaines cytokines (IL-1, IL-2) et des chimiokines (principalement CXCL8) (Taub et al. 1993). Le recrutement des PNN dépend de l'intensité et de la rapidité de diffusion de l'agent pathogène.

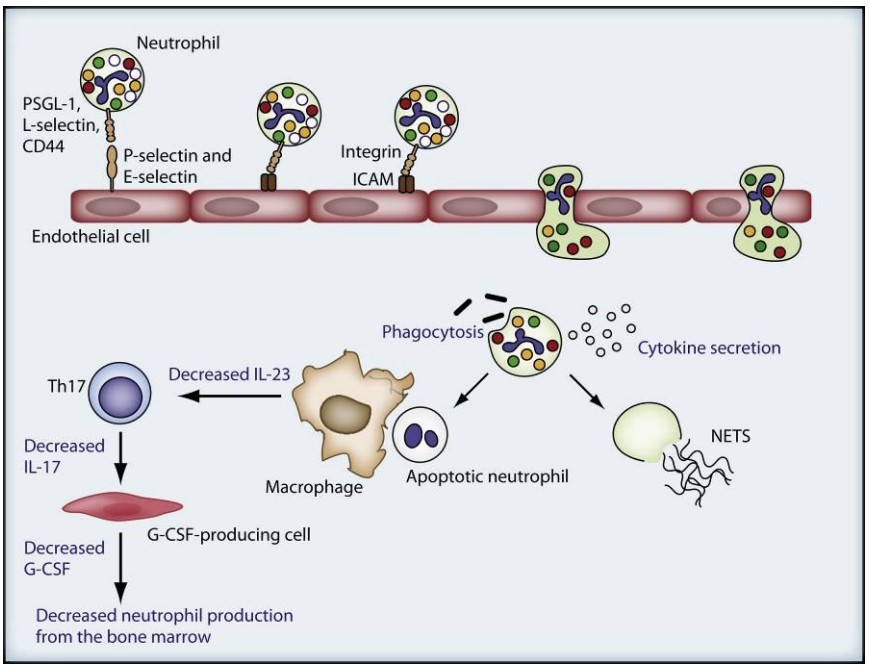


Figure 2 : Diapédèse des neutrophiles à travers la couche de cellules endothéliales (Borregaard 2010)

Dans le cas d'infection à *E. coli*, quelques heures après l'entrée des bactéries, de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires (IL-1α, CXCL8) sont détectables dans le lait. Elles sont suivies par le recrutement de nombreux PNN dans les premières heures de l'infection (entre 3 et 12 heures après son début) ; le retour à des niveaux normaux se fait dans les 24 heures suivantes (Riollet et al. 2000, Shuster et al. 1997). Lors d'une infection subclinique à *S. aureus*, le recrutement de PNN est moins intense et retardé de 24 à 48 heures après le début de l'infection. Mais, si l'intensité de l'infection est plus grande, les bactéries *S. aureus* peuvent se développer dans la glande mammaire, et des neutrophiles supplémentaires peuvent être recrutés rapidement (Burton et Erskine 2003; Leitner et al. 2000).

Phagocytose et activités bactéricides des neutrophiles

Sur le lieu de l'infection, les PNN activés reconnaissent des agents pathogènes grâce à des récepteurs immunologiques (CR1, CR3, FcR) ou non-immunologiques (récepteurs aux lectines, ou glycoprotéines) et des anticorps (IgM, IgG2) situés à la surface des cellules. Puis les PNN phagocytent les bactéries (Paape et al. 2002). Certaines cytokines, comme IL-1 et TNFα peuvent favoriser la phagocytose et l'activité bactéricide des PNN.

Cependant, il a été montré *in vitro* que la diapédèse diminue les capacités de phagocytose et d'activité bactéricide des PNN lors de leur migration à travers la couche de cellules épithéliales mammaires (Smits et al. 1999). De plus, les globules gras du lait et la caséine ingérés par les PNN entraînent une diminution des granules cytoplasmiques dans le cytoplasme ce qui réduit les activités bactéricides et ralentit la formation des pseudopodes qui sont nécessaires à la phagocytose. Ainsi, les capacités fonctionnelles des neutrophiles du lait sont inférieures à celles des neutrophiles du sang.

Après ingestion des bactéries, la plupart des PNN meurent par induction de mort cellulaire programmée (apoptose). Puis des macrophages recrutés sur le site de l'infection ingèrent par phagocytose les corps apoptotiques des neutrophiles (Paape et al. 2003).

En plus de leur capacité de phagocytose, les PNN sont une source de peptides antimicrobiens (AMP, *antimicrobial peptide*), comme les lactoferrines, les bacténécines, les défensines et les cathélicidines. L'activité bactéricide des neutrophiles est permise par deux catégories de mécanismes, qui se différencient selon qu'ils dépendent ou non de l'oxygène. Lorsque certaines fractions du complément ou des immunoglobulines se fixent sur les récepteurs des PNN, ces cellules deviennent actives et génèrent des espèces réactives à l'oxygène (ROS) par l'intermédiaire de l'oxydase NADPH. Cette réponse est suivie par une augmentation de la consommation d'oxygène et de l'activité des hexoses mono-phosphates ; ces phénomènes correspondent à la chaîne respiratoire. Les PNN synthétisent alors de grandes quantités de super-oxyde (O_{2^-}) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui interagissent entre eux et entraînent la formation d'autres radicaux libres (ROS). La plupart des agents pathogènes responsables de mammites (*S. aureus*, *E. coli*) est tuée par ces mécanismes (Paape et al. 2002).

Les activités bactéricides qui ne dépendent pas des ROS, sont liées à certaines protéines aux propriétés antibactériennes comme le complément, les défensines et les cathélicidines (Rainard et Riollet 2003; Brogden et al. 2003; Ganz 2003; Hirsch et al. 2008). Les neutrophiles peuvent aussi générer des pièges (*Neutrophil Extracellular Trap*), composés de molécules nucléaires et granuleuses qui se lient aux pathogènes et dégradent les facteurs de virulence et tuent à la fois des bactéries Gram (+) et Gram (-) (Brinkmann et al. 2004).

2.2.1.1.3 Les macrophages

Les macrophages facilitent les réponses immunitaires innée et/ou adaptative lors d'une infection bactérienne. Ces cellules sont présentes dans les glandes mammaires saines et infectées (Lee et al. 1980; Paape et al. 2002). Cependant, la proportion de macrophages dans les tissus infectés est bien inférieure à celle des neutrophiles, même si leur nombre augmente au cours de la réponse inflammatoire (Niemialtowski et al. 1988). Comme les neutrophiles, les macrophages expriment les récepteurs au fragment Fc à leur surface (Niemialtowski et al. 1988) et ont la capacité de phagocyter et tuer des agents pathogènes par l'intermédiaire de protéases ou de ROS (Miller et al. 1988). Certains anticorps opsonisants peuvent fortement augmenter l'activité de phagocytose des macrophages (Miller et al. 1988).

Les macrophages ont la capacité de sécréter des substances (prostaglandines, leucotriènes et cytokines) qui facilitent la migration et les activités bactéricides des neutrophiles, ce qui augmente fortement les processus inflammatoires locaux dans la glande mammaire (Kehrli et al. 1999; Van Kampen et Mallard 1997).

De plus, lors d'infection, les macrophages sécrètent de l'IL-12, qui peut aider au développement des cellules CD4+ et CD8+ cytotoxiques sécrétant de l'interféron γ (IFN-γ) (Riollet et al. 2000b) et conduisant à l'élimination des agents pathogènes. Bien que les macrophages ne soient pas considérés comme des cellules de défense, ils présentent des antigènes qui permettent la détection des agents pathogènes et l'initiation de la réponse inflammatoire. Lorsque la quantité d'immunoglobulines diminue, l'activité phagocytaire des macrophages décroit en parallèle (Waller 2000).

2.2.1.1.4 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques se situent sous la plupart des épithéliums de surface et dans la plupart des organes solides. Elles se différencient des macrophages principalement par la présence de l'intégrine a_x:β_2 aussi appelée CD11c:CD18 ou récepteur 4 du complément (CR4). Tout comme les macrophages, elles ont la capacité de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes et de les ingérer. Elles sont actives dans la capture des antigènes par phagocytose au moyen de récepteurs comme la lectine DEC205 ou le récepteur du mannose. Les antigènes captés peuvent être apprêtés et présentés sur des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II pour être reconnus par des cellules T CD4. D'autres antigènes extracellulaires sont prélevés de manière non spécifique par le processus de macropinocytose et sont présentés sur les molécules du CMH de classe I.

Outre les cellules dendritiques conventionnelles décrites ci-dessus, les cellules dendritiques plasmacytoïdes détectent des infections principalement avec le récepteur CXCR3 et produisent en abondance des interférons de type I et des cytokines pro-inflammatoires.

2.2.1.1.5 Les cellules naturelles tueuses

Les cellules NK sont des lymphocytes granuleux qui ont des activités cytotoxiques indépendantes du CMH mais qui utilisent des récepteurs Fc pour leur effet cytotoxique. Elles expriment à leur surface le CD16 qui est le récepteur du fragment Fc de l'IgG. Leur activité cytotoxique passe par l'exocytose de granules et la libération de cytokines. Les cellules peuvent tuer à la fois des bactéries Gram (+) et Gram (-), et peuvent participer à la protection contre les mammites (Sordillo et Streicher 2002).

2.2.1.1.6 Les cellules épithéliales mammaires

Les cellules épithéliales mammaires (CEM) sont considérées comme les premières cellules à initier le processus inflammatoire dans la glande mammaire. Elles servent non seulement de barrière physique entre le milieu extérieur et l'organisme en empêchant la pénétration des agents pathogènes, mais elles jouent aussi un rôle dans la réponse immunitaire. Les CEM après stimulation par des bactéries ont la capacité de sécréter des cytokines, des chimiokines et des peptides antimicrobiens (Lutzow et al. 2005; Griesbeck-Zilch et al. 2009). Leur rôle principal dans la glande mammaire pourrait être leur contribution au recrutement des neutrophiles et des lymphocytes.

Généralement, la reconnaissance des agents pathogènes dans la glande mammaire intervient à travers les récepteurs TLR. Les gènes codant pour TLR2 et TLR4 sont exprimés dans les CEM, même si leur expression au niveau protéique n'a pas été formellement démontrée. Ainsi, comme les CEM répondent bien à la stimulation par *S. aureus* et *E. coli*, il est probable que les CEM expriment certains récepteurs TLR.

2.2.1.2 La fraction soluble de l'immunité innée

Dans la glande mammaire, les principaux effecteurs de la réponse humorale sont les peptides antimicrobiens et les composés du système du complément.

2.2.1.2.1 Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens sont des petits polypeptides qui ont des effets antimicrobiens à des concentrations physiologiques dans l'organisme (Brogden et al. 2003; Ganz 2003). Ils sont présents dans différentes populations cellulaires comme les PNN, les macrophages et les cellules épithéliales. Les principaux peptides antimicrobiens chez les bovins sont les défensines, les cathélicidines et les peptides anioniques (Brogden et al. 2003).

Les défensines sont produites en grande quantité dans les cellules polynucléaires (Zasloff 2002; Goldammer et al. 2004). Chez les bovins, elles ont des activités antimicrobiennes avérées contre *S. aureus* et *E. coli* (Lutzow et al. 2005). Les défensines peuvent être exprimées dans la mamelle saine ou être induites lors d'une infection. Elles sont supposées jouer un rôle important dans la défense de la glande mammaire.

Les cathélicidines sont les principales protéines des granules des neutrophiles. Leur production est augmentée en présence d'infection (Zanetti 2005). Lors de la dé-granulation, les cathélicidines sont clivées par des protéases et libèrent un peptide C-terminal qui a des activités antimicrobiennes (Tomasinsig et Zanetti 2005).

Les lactoferrines sont produites par les cellules épithéliales et les leucocytes. Elles chélatent le fer et le rendent indisponible pour la croissance des microorganismes (Sordillo et Streicher 2002; Rainard et Riollet 2006). L'expression des lactoferrines semble fortement augmentée en présence de LPS (Schmitz et al. 2004), mais leur rôle dans la réponse immunitaire n'est pas bien connu.

2.2.1.2.2 Le système du complément

Le système du complément est impliqué surtout dans l'immunité innée avec la lyse des bactéries, l'opsonisation et l'attraction des phagocytes sur le lieu de l'infection (Rainard et

Poutrel 1995; Riollet et al. 2000b; Korhonen et al. 2000; Rainard et Riollet 2006). Le système du complément est activé par trois voies métaboliques différentes, qui conduisent toutes à l'activation de la convertase C3. La convertase est associée au complexe enzymatique qui clive C3. Ce clivage active le positionnement de C3b à la surface des microorganismes et libère C3a. C3a a un fort pouvoir chimio-attractant pour les cellules inflammatoires. C3b et ses sous-produits iC3b sont déposés à la surface des bactéries et permettent leur reconnaissance par les cellules phagocytaires (neutrophiles et macrophages). La protéine C5a du complément est également impliquée dans le recrutement des neutrophiles (Persson et al. 1993). On la retrouve dans le lait des vaches saines (Rainard et Poutrel 1995) et à plus forte concentration dans le colostrum ou lors d'infection surtout par *E. coli* ou *S. uberis*. Mais il semblerait qu'elle ne soit pas augmentée dans le cas d'infection à *S. aureus* (Shuster et al. 1997; Riollet et al. 2000b; Bannerman et al. 2004).

2.2.2 La réponse immunitaire acquise de la glande mammaire

Les principaux effecteurs de l'immunité acquise sont les anticorps, les lymphocytes B et les cellules T qui agissent ensemble sous l'action de diverses cytokines (Burton et Erskine 2003; Burvenich et al. 1994). Plusieurs types cellulaires de la glande mammaire, comme les cellules dendritiques, les cellules NK, les lymphocytes T γδ, les macrophages, les cellules CD4+ et CD8+ jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire locale (Burton et Erskine 2003).

2.2.2.1 Les lymphocytes et les défenses mammaires

Les lymphocytes représentent la population cellulaire majeure de l'immunité acquise, car ils sont capables de détecter des antigènes grâce à leurs récepteurs de surface, qui déterminent leur spécificité, leur diversité, la discrimination du soi et du non-soi (Sordillo et Streicher 2002; Park et al. 1992). Ils sont divisés en deux principales catégories : les lymphocytes B et les lymphocytes T.

Les lymphocytes B produisent les immunoglobulines après stimulation par des cytokines produites par les cellules T auxiliaires. Ces cytokines (IL-2, -4, -6 et -10) induisent la prolifération et la différenciation des lymphocytes B, soit en plasmocytes qui produisent des anticorps, soit en cellules mémoires. La proportion de lymphocytes B par rapport à la population totale de lymphocytes reste à peu près constante après une infection mammaire (Riollet et al. 2000a).

2.2.2.2 Les cellules B et les immunoglobulines

Les immunoglobulines (Ig) ou anticorps sont sécrétés par les lymphocytes B et sont présents dans tous les liquides biologiques de l'organisme, à des concentrations variables. Les lymphocytes B, activés par les antigènes bactériens, prolifèrent, migrent depuis l'épithélium sécrétoire vers les muqueuses et se différencient en cellules sécrétant massivement ces anticorps. Chez les ruminants laitiers, quatre classes d'immunoglobulines ont un rôle avéré dans le contrôle d'une infection (Guidry et Miller 1986): les IgA et les IgM synthétisées localement, les IgG1 arrivant du sang par transport sélectif et les IgG2 affluant du sang de façon passive par l'adhérence aux neutrophiles. Les IgA semblent empêcher l'adhésion des bactéries aux CEM et faciliter ainsi leur évacuation au moment de la vidange (Poutrel 1983). Elles pourraient aussi contribuer à neutraliser les toxines produites par les agents pathogènes

microbiens. Il a été montré que la concentration en IgA dans le lait est corrélée à l'activité phagocytaire des neutrophiles vis-à-vis de *S. aureus* (Burton et Erskine 2003). Les IgM, IgG1 et IgG2 jouent un rôle d'opsonines (Poutrel 1983; Rainard et Poutrel 1993; Sordillo et al. 1997). En effet, ces immunoglobulines reconnaissent et se fixent aux antigènes bactériens, directement ou avec des fragments du complément. Associées aux bactéries, elles se fixent à des récepteurs spécifiques des neutrophiles et macrophages, ce qui permet d'augmenter l'efficacité avec laquelle les cellules phagocytaires ingèrent et détruisent les microorganismes infectants. Les IgG2 et IgM sont principalement impliquées dans l'élimination de *S. aureus* par phagocytose après opsonisation (Burton et Erskine 2003). La forme IgG1 est l'immunoglobuline dominante dans le lait sain et le colostrum. Elle semble être impliquée dans la prévention de la colonisation bactérienne et la neutralisation des toxines (Burton et Erskine 2003).

2.2.2.3 Le rôle des cytokines dans la glande mammaire

Les cytokines régulent et coordonnent les réponses immunitaires par stimulation de l'activité de certaines cellules qui sont impliquées dans ces voies. Elles forment un réseau complexe qui régule les réponses immunitaires cellulaires ou humorales. Les cytokines comme IL-2 et IFNγ sont produites par exemple par les lymphocytes Th1. La voie Th1 peut éliminer la plupart des infections mammaires (Burton et Erskine 2003) et particulièrement celles à *S. aureus* (Lin et al. 2009). Au contraire, IL-4, -5 et -10 sont produites par des cellules Th2 et favorisent les réponses immunitaires humorales (Shafer-Weaver et al. 1999; Riollet et al. 2000a). Il existe une troisième voie qui repose sur les cellules Th17, qui sécrètent de l'IL-17a ou IL-17f entraînant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNFα, IL-1β, …) et des chimiokines (CXCL8, CXCL1, CXCL10, …) (Leung-Theung-Long et Guerder 2008).

Lors d'une infection mammaire, de nombreuses cytokines sont produites en grande quantité (paragraphe 2.3). Parmi elles, l'interleukine 8 (IL-8, CXCL8) est la principale cytokine responsable de la migration des neutrophiles (Kobayashi 2008). Les cytokines pro-inflammatoires induisent localement l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et favorisent ainsi la chimiotaxie des neutrophiles sur le site de l'infection. Elles peuvent aussi entraîner une augmentation de l'activité phagocytaire et bactéricide des neutrophiles (Sordillo et Streicher 2002) en augmentant l'expression des récepteurs Fc à la surface cellulaire.

De plus, les facteurs de croissance ou CSF (*colony stimulating factor*), MCSF (*macrophage* CSF) et les GMCSF (*granulocyte* MCSF) sécrétés en réponse à une infection, stimulent le développement et la différenciation de certaines cellules hématopoïétiques. Ainsi, ils jouent un rôle clé dans le déclenchement de la prolifération et le recrutement des cellules sur le site de l'infection.

Les cytokines ont la capacité de réguler la réponse immunitaire et permettent ainsi une bonne protection de la glande mammaire contre les agressions des agents pathogènes avec un minimum d'effets collatéraux sur le parenchyme mammaire. Leur étude est primordiale dans la compréhension des mécanismes cellulaires de réponse aux infections.

2.3 Variation du transcriptome lors d'infections mammaires

La puce à ADN (appelée microarray) permet de mesurer l'expression de centaines, voire de dizaines de milliers de gènes, simultanément. Ainsi, c'est un outil de choix pour comprendre les réponses cellulaires aux infections. En particulier, pour les IMI, plusieurs

études ont utilisé cette technologie sur différents types cellulaires : cellules somatiques du lait (CSL) prélevées *in vivo*, cellules épithéliales mammaires (CEM), macrophages ainsi que sur d'autres tissus (foie, tissu adipeux). Dans ce paragraphe, je me concentrerai sur les analyses du tissu mammaire.

Brièvement, l'infection de CSL soit par des bactéries Gram (+), soit par des bactéries Gram (-) conduit à l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires, telles que *il1b*, *il8, il12, ifnγ* et *tnfa* (Bannerman 2009), de marqueurs de l'inflammation, tels que la serum amyloïde et le *lipopolysaccharide* (LPS) *binding protein* (LBP) (Bannerman et al. 2004) et aussi de sous-unités du complément principalement *c3* et *c5a* impliqués dans le recrutement des neutrophiles et la stimulation de leurs activités bactéricides (Bannerman et al. 2004; Rainard et Riollet 2006). Au moment de la résolution de l'infection, des cytokines régulatrices de l'inflammation sont activées, telles que *il10*, mais elles sont absentes lors d'une infection à *S. aureus* (Bannerman et al. 2004). La comparaison de CSL infectées et de CSL saines a montré l'importance des cytokines, des chimiokines et de leurs récepteurs. Par exemple chez la chèvre, il y a plus d'*il1a*, de *cxcl6* et de *il2rγ* dans les hémi-mamelles infectées que dans les saines (Pisoni et al. 2010). Chez la vache, *il6, il8, il12, gmcsf* et *tnfα* sont plus exprimés dans les quartiers infectés (Alluwaimi et al. 2003; Lee et al. 2006), alors que *il4, il10* et *ifnγ* sont plus exprimés dans les quartiers sains (Peli et al. 2003). Lors d'infection à *S. aureus,* des cytokines (*ccr8, rantes, il17* et *mcsf*), des molécules impliquées dans la présentation des antigènes telles que *mhcI* et *tap2* et des molécules de reconnaissance telles que *cd14* et *icam3* sont activées (Tao et Mallard 2007), alors que les expressions d'*il2* et d'*ifnγ* diminuent au cours de l'infection (Alluwaimi et al. 2003).

En ce qui concerne, les réponses des CEM *in vitro* après stimulation par *E. coli*, des augmentations des facteurs immunitaires, tels que *ccl5, il6, il1, nos2, ccl20, il8, ccl2, cxcl5* et *cxcl2* sont observées après 1h de stimulation (Gunther et al. 2009). Après stimulation par *Streptococcus uberis* l'expression de cytokines pro-inflammatoires est augmentée, alors que des gènes relatifs à l'immunité ne sont pas modifiés (*c3, il1β, il6, il8, saa3, s100a&é, tlr2*) (Swanson et al. 2009). Une stimulation de CEM par *S. aureus* entraîne aussi l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires, telles que *cxcl1, cxcl2, ifnγ, il6, il8, il1β* et la leptine, ainsi que de *s100a12* et *ptx3* dont l'expression a été vérifiée à un niveau protéique (Lutzow et al. 2008). Ainsi, les CEM ont la capacité d'initier la réponse immunitaire *in vivo*.

Toutefois, au sein de la glande mammaire, il existe de grandes différences des réponses cellulaires en fonction de la localisation des cellules et de la cinétique de pénétration des agents pathogènes. Ainsi, la réponse du trayon est plus rapide et plus forte que celle de la glande mammaire et la rosette de Furstenberg sécrète plus de *nos2* qui est impliqué dans la production de molécules bactéricides (Rinaldi et al. 2010). La réponse dépend aussi des populations de cellules résidentes et des neutrophiles recrutés qui ne le sont pas de façon homogène dans la glande mammaire (Rinaldi et al. 2010).

Récemment, il a été montré que des macrophages cultivés *in vitro* avec du LPS exprimaient *tlr4, tlr2* et *cd14*, mais que cette activation ne passait pas par la voie de MYD88 et que les cytokines pro-inflammatoires *tnfa, il6, il8* et *il1b* étaient exprimées, ainsi que la cytokine anti-inflammatoire *il10* et le gène *nos2* (Taraktsoglou et al. 2011). Mais il n'y a pas d'information disponible sur la réponse des macrophages vis-à-vis de *S. aureus*.

Ainsi, les réponses cellulaires après une infection dépendent de nombreux facteurs, dont le type cellulaire et la bactérie. La réponse à *E. coli* se traduit par des sécrétions de cytokines plus rapides et plus fortes que celle à *S. aureus* (Bannerman 2009). Le type de stimulation (bactérie vivante, bactérie inactivée, ou PAMP) et la durée de la stimulation

influencent aussi les résultats. Cependant, les capacités de réponse de l'hôte semblent être un facteur déterminant pour les réponses cellulaires aux infections (Burton et Erskine 2003).

En 2008 au début de ma thèse, aucune étude prenant en compte la variabilité de l'hôte en réponse aux IMI n'avait été réalisée. C'est pourquoi, il était intéressant d'étudier la réponse aux infections en fonction de la sensibilité / résistance de l'hôte. Depuis l'équipe de Schwerin a développé deux modèles bovins ayant des capacités de réponse aux IMI différentes. Dans le premier les vaches ont été sélectionnées sur des SCS extrêmes et dansle deuxième sur un QTL associé au SCS et positionné sur le chromosome BTA18 (Kühn et al. 2003 ; Kuhn et al. 2008). Les deux modèles et le nôtre permettent d'améliorer la compréhension des interactions hôtes-agents pathogènes.

3 Lutte contre les mammites : des méthodes curatives et préventives

Les défenses intrinsèques de la mamelle et les défenses immunitaires ne sont pas suffisantes pour éviter les IMI. Des actions peuvent alors être mises en place pour soigner les animaux atteints et pour prévenir les infections. Dans ce paragraphe, je vais tout d'abord présenter les méthodes de lutte classique contre les IMI : méthode curative (traitements antibiotiques) et traitements préventifs (suivi sanitaire du troupeau et vaccination). Dans un deuxième temps j'aborderai les efforts collectifs qui sont mis en place pour faire diminuer l'incidence des mammites : l'amélioration génétique. Je commencerai par décrire les paramètres génétiques et présenter comment ils sont utilisés en sélection, puis je présenterai les outils de la génétique moléculaire ainsi que leur utilisation en sélection.

3.1 Méthodes de lutte classique

3.1.1 Des traitements curatifs : les antibiotiques

En cas d'IMI, les traitements vétérinaires reposent essentiellement sur l'utilisation d'antibiotiques. Selon la gravité des symptômes ils sont soit appliqués par voie intra-mammaire localement, soit par voie générale. Lorsque les symptômes cliniques sont très prononcés, les deux voies peuvent être associées. Les antibiotiques permettent de réduire significativement l'incidence des mammites. Mais ils ne sont pas efficaces lorsque les bactéries ont pénétré à l'intérieur des neutrophiles ou des CEM (Sutra et Poutrel 1994; Aungier et Austin 1987).

Le respect de la posologie est un critère déterminant pour l'efficacité du traitement. Une diminution de la durée de traitement augmente les risques de rechute des vaches (Barkema et al. 2006). Ces risques de rechute sont souvent liés au fait que les bactéries étaient toujours présentes dans la mamelle et qu'elles se multiplient à nouveau après l'arrêt du traitement antibiotique. De nos jours, l'utilisation excessive d'antibiotiques chez l'homme a conduit à l'apparition de forme de résistance de *S. aureus* à la méthillicine (MRSA). Récemment, des souches de MRSA ont été identifiées dans des troupeaux laitiers (Spohr et al. 2011). Pour diminuer l'impact de ces nouvelles souches, il est recommandé de diminuer l'utilisation d'antibiotiques (Teuber 2001; Phillips et al. 2004). Auparavant, un traitement antibiotique des vaches était recommandé systématiquement lors du tarissement. Aujourd'hui seules les vaches infectées reçoivent un traitement antibiotique. Le reste du troupeau peut recevoir un traitement préventif, sans antibiotique ou rien du tout.

Les techniques d'identification des agents pathogènes (diagnostic bactériologique) permettent d'adapter le traitement à l'agresseur. Une bonne connaissance des réponses immunitaires chez les ruminants peut aussi permettre de développer de nouvelles alternatives pour lutter contre les mammites.

3.1.2 Des méthodes préventives

Certaines pratiques préventives peuvent aider à maintenir un bon état sanitaire du troupeau.

3.1.2.1 Hygiène et gestion du troupeau

Une thérapie du troupeau hors lactation, accompagnée de bonnes pratiques hygiéniques, notamment au moment de la traite, sont des outils efficaces pour contrôler les mammites à *Staphylococcus* (Hutton et al. 1990). Pour diminuer l'incidence des mammites il est conseillé : i) de laver les trayons avant la traite, avec une serviette différente pour chaque animal, ii) de tremper les trayons dans une solution désinfectante après la traite, iii) d'utiliser des gants et iv) de désinfecter la salle de traite (Sutra et Poutrel 1994). Il est aussi important de tester et d'entretenir régulièrement la machine à traire pour éviter des problèmes de sur-traite qui peuvent entraîner des lésions du trayon (Hillerton et al. 2002).

Le fait de nourrir les vaches juste après la traite permet au trayon d'avoir le temps de se refermer avant que les vaches ne se couchent et que le trayon soit en contact avec la litière souillée (Bartlett et al. 1992). Récemment, il a été montré que le respect des règles ci-dessus permettait de diminuer les CCS (Barkema et al. 1998; Plozza et al. 2011). De plus, le traitement et l'isolement si nécessaire des animaux atteints permettent de limiter les contaminations entre animaux. L'élimination des animaux avec des mammites chroniques ou récurrentes permet aussi de mieux gérer l'état sanitaire global du troupeau (Neave et al. 1969).

L'obturation des trayons lors du tarissement pour limiter l'entrée des agents pathogènes dans la mamelle permet de limiter les IMI.

L'ensemble de ces pratiques permet de diminuer l'exposition des mamelles à des agents infectieux et de limiter la transmission des IMI entre différents animaux. Cependant, elles ne permettent pas d'éradiquer les mammites.

3.1.2.2 Vaccination

Depuis quelques années, de nombreux efforts ont été réalisés pour développer des vaccins efficaces contre les agents responsables des mammites. Malgré quelques essais (Middleton et al. 2006; Leitner et al. 2003; Middleton et al. 2009; Lee et al. 2005; O'Brien et al. 2001), aucune immunité prometteuse et à longue durée n'a été obtenue contre les infections à *S. aureus*. Pour la plupart des vaccins les essais terrain n'ont pas été concluants à l'exception de celui de l'équipe de Leitner (2003). Ils ont montré qu'après vaccination, les CCS de vaches en première lactation étaient plus faibles (moins 42%) et que les vaches produisaient 0,5kg de lait de plus par jour, même si la fréquence des cas cliniques dans les deux groupes de vaches n'était pas différente (1,3% contre 2,7%) (Leitner et al. 2003). Quelques essais ont aussi été menés chez la brebis, mais les résultats ont montré des efficacités variées (Watson 1988; Amorena et al. 1994).

L'efficacité des vaccins dépend des molécules de *S. aureus* incorporées : i) cellules vivantes, atténuées ou tuées, ii) toxines (hémolysines α et β), iii) PAMP (Calzolari et al. 1997; Gilbert et al. 1994; Mamo et al. 1994; Watson et al. 1996; Pankey et al. 1985), mais aussi des adjuvants et de la voie d'administration du vaccin (O'Brien et al. 2001; Tollersrud et al. 2002; Lee et al. 2005). L'efficacité des vaccins peut être limitée : i) par l'accessibilité de certains PAMP si présence de capsules autour des bactéries, ii) par l'évolution rapide des souches bactériennes et de leurs PAMP. Les mammites étant causées principalement par des bactéries d'espèces différentes, des études de vaccins à large spectre sont en cours.

En France, le vaccin STARTVAC des laboratoires HIPRA dirigé contre *S. aureus* et *E. coli* est utilisé chez les vaches et les brebis laitières. Il permet de diminuer les mammites à *E. coli*, *S. aureus* et à staphylocoques à coagulase négative, de réduire la gravité des symptômes, d'accélérer la guérison des mammites cliniques et de diminuer la contagion du milieu extérieur en diminuant le nombre de vaches infectées.

Toutefois, même si certains vaccins ont une efficacité reconnue pour diminuer l'incidence des mammites cliniques et subcliniques, ils ne permettent pas actuellement d'éradiquer les IMI. Une autre approche préventive consiste à favoriser les défenses immunitaires des animaux et à sélectionner des animaux plus résistants.

3.2 L'amélioration génétique

Pour pallier les problèmes d'efficacité des vaccins et limiter l'impact des IMI sans recourir à l'utilisation systématique des traitements antibiotiques, une alternative consiste à améliorer les capacités intrinsèques de l'hôte à résister aux IMI. Cette stratégie présente l'avantage d'être durable puisque les gains de résistance se transmettent de générations en générations.

Dans cette section, je commencerai par définir la résistance aux IMI. Puis je donnerai des définitions et des valeurs des principaux paramètres génétiques des critères liés aux IMI. Ensuite, j'aborderai brièvement l'utilisation de ces critères en sélection. Enfin, je présenterai les bases de la génétique moléculaire et ses apports en sélection par rapport à une sélection sur index.

3.2.1 Qu'est-ce que la résistance et comment la mesurer ?

Le caractère de résistance correspond à la capacité des animaux i) à éviter l'entrée des agents pathogènes dans l'organisme, ii) à augmenter les réponses immunitaires capables de limiter le développement des agents pathogènes dans l'organisme, iii) à mieux les éliminer et iv) à contrôler les effets des agents pathogènes (par exemple, la dégradation des tissus). En revanche, un animal tolérant aux mammites peut héberger un agent pathogène qui peut croître, l'hôte ne présentant pas de dégâts liés à la présence de l'agent pathogène (Medzhitov 2009) et un animal résilient est un animal tolérant dont le niveau de production n'est pas diminué en présence des agents pathogènes. Les animaux tolérants et résilients peuvent donc représenter des sources de contamination pour les autres animaux d'un troupeau. Il est donc préférable de les réformer.

Concernant les mammites, les animaux tolérants ou résilients sont des animaux ne présentant pas de signes cliniques, mais dont la bactériologie du lait est positive, alors que les animaux complètement résistants ont une bactériologie du lait négative. Le compartiment infecté (tissu mammaire) étant directement en contact avec le lait, la présence d'agents

pathogènes même s'ils n'entraînent pas des signes cliniques, provoquent une contamination du lait qui est problématique pour la consommation humaine. Ainsi, les objectifs de l'amélioration génétique se focalisent sur des animaux résistants et non pas tolérants ou résilients.

Les gènes ou les mécanismes mis en place chez les animaux résistants n'étant pas connus, un moyen d'approcher la résistance est de distinguer les animaux malades des animaux sains. En effet, les mammites étant des maladies infectieuses multifactorielles et les élevages laitiers étant de plus en plus intensifs, la pression d'infection est généralisée, ce qui signifie que tous les animaux peuvent être en contact avec des agents pathogènes responsables de mammites. Ainsi, à l'échelle d'une population, les animaux qui ne sont jamais atteints peuvent être considérés comme des animaux résistants. Dans le cadre des mammites, pour discriminer les animaux atteints des animaux sains, le statut bactériologique de la glande mammaire est mesuré à un moment donné ou pendant une période de référence.

Sa mesure repose sur les différents critères qui ont été développés dans le paragraphe 1.4 avec des mesures qui correspondent au diagnostic exact des infections (diagnostic bactériologique du lait et détection des cas cliniques) et des mesures qui permettent prédire le statut infectieux de la mamelle selon l'intensité de la réponse inflammatoire (conductivité du lait et CCS). Dans ce paragraphe, je ne développerai pas la conductivité électrique du lait. Pour que le critère mesuré puisse être utilisé en sélection, il faut qu'il soit pertinent et donc bien corrélé avec le phénotype recherché, qu'il soit mesurable facilement et à grande échelle, qu'il soit peu coûteux et qu'il soit héritable, c'est-à-dire qu'il existe une variabilité génétique.

3.2.2 Les paramètres génétiques

Les différents critères de mesure de la résistance aux mammites sont considérés comme des caractères polygéniques, c'est-à-dire qu'il existe un grand nombre de gènes qui ont un petit effet sur ces caractères et qui expliquent l'état de résistance d'un animal. En génétique quantitative, l'estimation de paramètres génétiques permet de quantifier, sans connaissance *a priori* de ces gènes, l'origine génétique de la résistance.

La connaissance des paramètres génétiques de ces caractères est indispensable pour choisir les objectifs et critères de sélection. Elle détermine le progrès génétique attendu. Je vais commencer par donner les définitions des principaux paramètres génétiques, puis je donnerai des informations sur les valeurs de ces paramètres pour les caractères de résistance aux mammites.

Définitions

Variance génétique additive (V_g) : les variations d'un phénotype sont toujours dues à des facteurs environnementaux (alimentation, climat, …) et à des différences entre les génotypes individuels, transmissibles à la descendance, celles-ci correspondent à la variabilité génétique.

$$\sigma_p^2 = \sigma_g^2 + \sigma_i^2 + \sigma_e^2$$

$$\sigma_g^2 = \sigma_a^2 + \sigma_d^2$$

où σ_p^2 est la variance phénotypique, elle correspond à la variance totale,

σ_g^2 la variance génétique,

σ_a^2 la variance génétique additive

σ_d^2 la variance de dominance

σ_i^2 la variance d'épistasie

σ_e^2 la variance environnementale.

Héritabilité (h^2) : l'héritabilité est une donnée statistique évaluant la part de la variabilité génétique dans la probabilité d'apparition d'un caractère phénotypique donné au sein d'une population donnée. On la calcule de la façon suivante :

$$h^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_p^2}$$

Corrélation génétique ($\mathbf{r_g}$) : proportion de variance que deux caractères partagent due à des causes génétiques. Pour deux caractères a et b, on la calcule avec la formule suivante :

$$r_g = \frac{\mathrm{cov}\,ar(a,b)}{\mathrm{var}(a)\mathrm{var}(b)}$$

Bactériologie du lait

L'héritabilité du diagnostic bactériologique est estimée à 0,02 et 0,04 (Weller et al. 1992). Ainsi, il existe une variabilité génétique liée à ce caractère, mais elle est très faible par rapport à la variance environnementale.

Mammites cliniques

Il en est de même pour les mammites cliniques (MC) qui ont aussi une héritabilité très faible entre 0,02 et 0,04 chez les vaches (Mrode et Swanson 1996; Detilleux 2002; Rupp et Boichard 2003; Rupp et Foucras 2010).

Chez les ovins laitiers et les caprins, aucune donnée de paramètres génétiques n'est disponible pour les mammites cliniques aiguës ou subaiguës car leur fréquence est faible dans la population (5%).

Les concentrations de cellules somatiques

Les paramètres génétiques ne sont pas calculés directement sur les CCS, mais sur les scores de cellules somatiques (SCS) qui sont calculés à partir d'une transformation logarithmique des CCS (Ali et Shook 1980) permettant de normaliser la distribution des données :

$$SCS = \log_2\left(CCS / 100000\right) + 3$$

Les SCS prennent généralement des valeurs continues entre 0 et 9. La valeur 3 correspond à un CCS de 100 000 cellules/ml et une augmentation de 1 unité du SCS correspond à un doublement des CCS.

Les estimations de l'héritabilité des SCS sont de 0,15 en moyenne chez les bovins laitiers (Mrode et Swanson 1996; Detilleux 2002; Rupp et Boichard 2003), entre 0,11 et 0,14 chez les ovins laitiers (revue Rupp et al. 2010) et entre 0,20 et 0,24 chez les caprins laitiers (Rupp et al. 2011).

La corrélation génétique entre les SCS et l'infection bactérienne est proche de 1 chez la vache (Weller et al. 1992), ainsi les CCS et les mammites subcliniques correspondent presque au même caractère. Celle entre les SCS et les mammites cliniques est de 0,70 en moyenne avec des valeurs allant de 0,30 à 0,80 selon les auteurs (Mrode et Swanson 1996; Rupp et Boichard 2003; Carlén et al. 2004; Koivula et al. 2005; Bloemhof et al. 2009; Bonaiti et al. 2005) ou 0,60 (Heringstad et al. 2000). Ces valeurs relativement élevées suggèrent des mécanismes communs qui conduisent à une meilleure résistance aux IMI modérées à sévères (avec des SCS élevés) et aux MC, malgré le fait que différents pathogènes puissent être impliqués dans ces deux types d'IMI.

Par ailleurs, des associations génétiques favorables modérées (de 0,20 à 0,50) sont généralement rapportées entre SCS ou MC d'une part et des caractères de morphologie mammaire d'autre part (Barillet et al. 2007; Bonaiti et al. 2005). Ceci indique que l'anatomie de la mamelle participe à la résistance de l'animal aux IMI.

D'après la littérature, il existe un antagonisme génétique entre la résistance aux mammites (SCS et MC) et les caractères de production, ce qui a probablement conduit à la dégradation de la santé de la mamelle en conséquence de la sélection sur les caractères de production. La corrélation génétique entre SCS et rendement en lait se situe généralement entre 0,10 et 0,20 chez la vache (Mrode et Swanson 1996; Rupp et Boichard 2003; Carlén et al. 2004; Koivula et al. 2005; Rupp et Foucras 2010). Les valeurs chez les ovins sont très différentes d'une étude à l'autre, allant de valeurs antagonistes (Rupp et al. 2003; Riggio et al. 2007) à favorables (el-Saied et al. 1999; Othmane et al. 2002; Serrano et al. 2003; Legarra et Ugarte 2005), mais toujours modérées. Chez les chèvres, ces valeurs varient de -0,13 à 0,12 (Rupp et al. 2011). Il existe aussi des corrélations entre la résistance aux mammites et la conformation de la mamelle chez les vaches (Mrode et Swanson 1996; Rupp et Boichard 2003), les brebis (Legarra et Ugarte 2005; Allain et al. 2010) et la chèvre (Rupp et al. 2011). Des mamelles plus hautes et plus étroites, mieux attachées, sont associées à des SCS plus faibles. La conformation de la mamelle est donc un prédicteur de la santé de la mamelle, sans pour autant que l'on puisse clairement distinguer cause et conséquence.

La réponse immunitaire

Outre les données CCS et mammites cliniques, quelques auteurs se sont concentrés sur des caractères en relation avec les mécanismes de défense de l'hôte (revue Rupp et al. 2010). En particulier, les aspects génétiques du fonctionnement des neutrophiles ont été étudiés (Sordillo et al. 1997; Rainard et Riollet 2006). L'existence d'un effet mâle a été mise en évidence pour la phagocytose *in vitro* des neutrophiles du sang (Lostrie-Trussar et al. 1984; Kehrli et al. 1991; Macdonald et al. 1994). La migration (0,2 à 0,5) et la phagocytose (0,3 à 0,7) des neutrophiles et l'activité du complément (0,4 à 0,5) ont des héritabilités modérées (Detilleux et al. 1994). Des animaux avec de faibles fréquences d'IMI ont tendance à avoir un meilleur fonctionnement de leurs neutrophiles (Kelm et al. 1997).

D'autres études ont montré que la réponse immunitaire par les anticorps a une héritabilité modérée à forte, de 0,32 à 0,64 pour les anticorps du sérum après vaccination, et de 0,13 à 0,88 pour les antigènes de *E. coli* pour des vaches au moment de la parturition (Wagter et al. 2000).

L'ensemble de ces mécanismes pourraient donc jouer un rôle important dans le déterminisme génétique de la résistance aux mammites, mais leur relation génétique avec la résistance reste peu explorée.

3.2.3 Génétique quantitative et sélection

Pour un caractère donné, si les paramètres génétiques établis ont des valeurs d'index et de précision suffisantes, il pourra être utilisé en sélection. Un caractère pertinent doit être héritable, bien corrélé avec le caractère sur lequel on veut agir et facile à mesurer à grande échelle et à faible coût.

Les objectifs des programmes de sélection se basent sur une diminution de la fréquence des mammites cliniques et des mammites subcliniques. A cause de leurs coûts et de leur faible taux d'enregistrement, les diagnostics bactériologiques du lait ne sont pas exploités en sélection.

Dans les pays scandinaves, l'enregistrement systématique des cas de mammites cliniques (MC) dans des bases de données depuis une trentaine d'années a permis d'établir des index de taureaux sur ce caractère. Les index sont définis sur la généalogie et les mesures phénotypiques de 200 filles, d'où la précision des index malgré la faible héritabilité des MC (Heringstad et al. 2000).

En France, la généralisation de l'enregistrement des MC est récente (paragraphe 1.4.2) et ce caractère n'est utilisé en sélection que depuis 2010. Mais jusqu'à présent le coefficient de détermination de cet index n'est pas très élevé. Chez les ovins laitiers et les caprins, comme la fréquence des MC est très faible (5%), aucun index sur les MC n'est disponible.

En revanche, les SCS représentent un critère de choix grâce à leur corrélation génétique très forte avec les mammites subcliniques (presque 1) et cliniques (0,7 en moyenne) et à sa facilité de mesure à grande échelle et à faible coût (paragraphe 3.2.2). Ainsi, en France et dans de nombreux autres pays, la sélection est actuellement basée sur une diminution des CCS, dans l'objectif de réduire la fréquence des mammites cliniques et subcliniques.

Les données élémentaires des CCS sont collectées dans le cadre du contrôle laitier. Chez les bovins laitiers, l'enregistrement des données de CCS a démarré au début des années 90. La base de données nationale contenait en 2010, plus de 300 millions de contrôles mensuels avec CCS, correspondant à environ 30 millions de lactations dans toutes les races

bovines laitières françaises (Rupp 2010). Chez les ovins laitiers, l'enregistrement systématique des CCS individuels a été mis en place à partir de 1999 pour les troupeaux pratiquant un contrôle laitier qualitatif officiel. Il repose sur une procédure simplifiée d'enregistrement. L'information recueillie consiste en 2 à 4 mesures individuelles de CCS par lactation, collectées après une période d'allaitement de 25 jours (Rupp et al. 2002). En 2010, la base nationale ovine de données contenait près de 2 millions d'enregistrements élémentaires de CCS issus de plus de 700 000 lactations de brebis de race Lacaune et des races ovines laitières des Pyrénées (Rupp 2010).

3.2.3.1 Evaluation génétique : calcul de l'index SCS

L'indexation consiste à estimer la valeur génétique des reproducteurs en utilisant toute l'information phénotypique des SCS valide et les relations de parenté (généalogies) disponibles dans la base de données génétique à l'aide du modèle BLUP (*Best Linear Unbiased Prediction*). La première indexation française sur les CCS a été réalisée en 1997 chez les bovins laitiers (Boichard et Rupp 1997) et en 2002 chez les ovins laitiers (Rupp et al. 2003). Elle existe chez la chèvre à titre expérimental (Rupp et al. 2011) et son officialisation est à l'étude. La sélection porte actuellement sur un critère moyen par lactation (LSCS), qui est calculé comme la moyenne arithmétique pondérée des SCS élémentaires ajustés pour le stade de lactation (Rupp et al. 2002). L'ensemble des facteurs correctifs vise à corriger la variabilité dans le nombre et la répartition (dans le temps) des SCS élémentaires utilisés pour calculer le LSCS, en particulier pour les lactations non encore terminées. Chez les bovins, il est basé sur les trois premières lactations alors que chez les ovins, il n'utilise l'information que des deux premières lactations.

Le modèle d'analyse de l'index individuel considère l'effet du troupeau, de l'année et de l'âge des animaux. Les index SCS sont exprimés en écart-type génétique, avec une inversion du signe par rapport au SCS de telle sorte que les index prennent des valeurs principalement comprises entre -3 et 3 et que les index positifs sont favorables, c'est-à-dire qu'ils correspondent à des SCS plus faibles.

La sélection a permis une amélioration de 0.5 unité de l'index SCS entre les jeunes taureaux de 2001 et ceux de 2003 (d'après Rupp, 2010b). Mais pour les brebis laitières, l'enregistrement des données CCS et l'exploitation des SCS sont trop récents pour observer une évolution.

Actuellement, le modèle d'indexation repose sur la moyenne des SCS par lactation. Or des études sont en cours pour prendre en compte toutes les valeurs mensuelles dans un modèle 'contrôles élémentaires' qui serait plus précis mais plus complexe.

3.2.3.2 Utilisation de l'index SCS dans les programmes d'amélioration génétique

La sélection doit permettre de répondre aux différentes attentes des éleveurs, à savoir améliorer la productivité laitière tout en diminuant l'impact des IMI. Ainsi les objectifs de sélection reposent sur une combinaison linéaire de l'ensemble des caractères d'intérêt pondérés par leur importance économique.

Dans les races bovines laitières, l'index de synthèse ISU est calculé à partir de l'index de sélection laitière (INEL), de l'index SCS et de trois autres index fonctionnels (morphologie, fertilité femelle et longévité fonctionnelle). Le poids de l'index SCS par

rapport à l'INEL est de 0,25 (Rupp 2010). L'introduction du nouvel index « mammites cliniques » devrait permettre d'améliorer la réponse sur la fréquence des cas cliniques.

En brebis laitière (race Lacaune), un premier index de synthèse intégrant les cellules et les caractères de morphologie a été défini en 2005 (Barillet et al. 2007). Depuis 2007, le poids de 0,5 accordé aux caractères fonctionnels (0,5xCEL et 0,5xMorphologie) est équivalent au poids accordé aux caractères de production (0,5 également) dans un index global appelé ISOL (Index de Synthèse Ovins Lait). Les objectifs de cette sélection sont de réduire d'un écart type génétique du caractère LSCS en 10 ans (Rupp 2010). Chez les ovins, l'enregistrement systématique des réformes pour cause de mammites a démarré en 2003 et devrait permettre d'évaluer l'évolution du taux de réforme liée aux infections mammaires.

3.2.4 Les apports de la génétique moléculaire

Pour améliorer la sélection sur index, une approche complémentaire commence à être utilisée. Elle repose sur l'identification de zones chromosomiques polymorphes fortement associées à un caractère et sur l'incorporation de cette information dans le choix des reproducteurs.

Dans cette partie, je vais tout d'abord définir le polymorphisme de l'ADN et donner les caractéristiques du génome ovin, puis je vais présenter les différentes régions chromosomiques associées aux mammites et enfin je donnerai quelques éléments pour l'utilisation de cette information moléculaire dans les programmes de sélection.

3.2.4.1 Le polymorphisme de l'ADN

Le génome du mouton domestique [Ovis aries]

Le support de l'information génétique est l'ADN (Acide Désoxyribo Nucléique). Il est composé de zones codantes (les gènes) qui représentent environ 1,5% du génome avec un ou plusieurs exons qui peuvent être traduits et des introns qui sont éliminés. Parfois un épissage alternatif entraîne la production de différents transcrits à partir d'un même gène. En amont des séquences codantes se situent une zone promotrice qui commande la transcription d'un gène ou de plusieurs gènes, on parle alors de clusters de gènes. Le reste de la molécule d'ADN se répartit entre les nombreuses zones régulatrices (cis régulation, trans régulation, micro ARN…) et de zones non codantes dont le rôle biologique n'est pas toujours connu.

Les mammifères sont des **espèces diploïdes** *ie* l'ensemble des molécules d'ADN est présent en deux exemplaires ; les animaux héritent d'un chromosome du père et d'un chromosome de la mère. Le nombre de chromosomes est très variable d'une espèce à l'autre. L'espèce *Ovis aries* possède 26 paires de chromosomes autosomaux et 2 de chromosomes sexuels, la vache 29 paires de chromosomes autosomaux, la souris 19 et l'homme 22.

Le génome d'*Ovis aries* est composé d'environ 3 milliards de paires de bases (3 giga bases) et de 20 à 30 000 gènes. Si la séquence bovine a été publiée pour la première fois en 2004 (Hampton 2004), puis complétée en 2009 (The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium et al. 2009), la séquence ovine n'est disponible que depuis 2010. La première version se basait sur une comparaison avec la séquence bovine, puis la deuxième version se basait sur un assemblage *de novo* de la séquence ovine (The International Sheep Genomics Consortium et al. 2010) disponible sur le site internet de http://www.livestockgenomics.csiro.au/cgi-bin/gbrowse/oarv2.0/ Actuellement, le positionnement des gènes sur le génome ovin est dérivé de l'annotation bovine et de la

comparaison des séquences génomiques ovine et bovine. Dans cette version du génome, 20199 gènes sont annotés. Une comparaison entre les génomes ovin et bovin montre que 90% des séquences sont communes et que les séquences des exons des ovins sont plus courtes que celles des bovins (Jiang et Dalrymple 2011).

Les différentes catégories de polymorphismes

Il existe des variations de la séquence d'ADN à un locus particulier, qui se traduisent par la présence de **plusieurs allèles** (**polymorphisme**). Le polymorphisme est généré par des **mutations**. Si une mutation apparaît dans les cellules germinales, elle pourra être transmise à la descendance en fonction des aléas de la méiose. Cette transmission est sous l'influence de la sélection naturelle, la sélection volontaire, la dérive génétique et les migrations de population. Ainsi, les mutations favorables aux animaux porteurs se diffusent dans la population tandis que des mutations très défavorables voire létales sont éliminées. La fréquence des mutations est extrêmement faible (10^{-6}), mais après des milliers de générations, il existe de nos jours de nombreuses séquences d'ADN polymorphes. Ces polymorphismes peuvent être de différente nature. Ils peuvent être situés sur une séquence d'ADN formée par une répétition continue de motifs composés de 1 à 10 nucléotides (**microsatellite**) ou n'être situés que sur une seule base (**polymorphismes d'un seul nucléotide,** *Single Nucleotid Polymorphism*, **SNP**). Les SNP sont présents toutes les 100 à 300 paires de bases sur le génome humain. D'autres formes de polymorphisme sont dues à une **variabilité du nombre de copies** d'un fragment d'ADN (**CNV**).

Même si les polymorphismes de l'ADN sont présents sur l'ensemble du génome, il existe des zones où leur présence est plus fréquente. Les microsatellites sont, par exemple, souvent situés dans des introns ou des exons. L'objectif de l'amélioration génétique est d'identifier les polymorphismes de l'ADN qui sont favorables à un caractère et de les sélectionner.

3.2.4.2 Les QTL associés à la résistance aux mammites

Grâce à l'évolution des techniques de génétique moléculaire des données s'accumulent sur l'existence de QTL (*Quantitative Trait Loci* QTL) associés à la résistance aux mammites. On peut dorénavant considérer que certains gènes ont des effets légèrement supérieurs sur le caractère étudié et permettent de déterminer une part non négligeable de la variance génotypique d'un phénotype. Ces QTL sont associés aux SCS ou aux mammites cliniques. Ils ont été résumés dans plusieurs ouvrages et synthèses (Rupp et Boichard 2003; Khatkar et al. 2004; Smaragdov 2006; Ogorevc et al. 2009; Rupp et Foucras 2010). Chez les bovins, 80 QTL ont été mis en évidence. Ils sont situés sur l'ensemble des chromosomes autosomes à l'exception de BTA12, 17 et 28 et ils sont plus nombreux sur BTA5, 6, 7, 9, 11, 14, 15, 18 et 23 (Rupp et Foucras 2010). En particulier, un QTL associé au SCS a été identifié sur BTA18 par une équipe allemande (Kühn et al. 2003), qui a initié un protocole de sélection de vaches sur ce QTL (Kuhn et al. 2008). Pour comprendre les mécanismes de réponse des vaches avec l'allèle favorable et de celles avec l'allèle défavorable, ils ont cultivé *in vitro* des cellules épithéliales mammaires primaires qu'ils ont ensuite infectées soit avec *E. coli*, soit avec *S. aureus* et ils ont tout d'abord mesuré l'expression de quelques cytokines et chimiokines par qPCR (Griesbeck-Zilch et al. 2009), puis de nombreux gènes par microarray (Brand et al. 2011) sur une cinétique de 24h. Les résultats de ces études seront régulièrement comparés aux résultats que nous avons obtenus.

En France entre 15 et 30 QTL associés à la résistance aux mammites ont été identifiés dans les trois principales races laitières Holstein, Normande et Montbéliarde (Fritz et al. 2008). Chez les brebis laitières, plusieurs QTL pour les SCS ont été publiés dans le cadre de protocoles basés sur l'utilisation de marqueurs microsatellites en France et en Espagne (Rupp et al. 2003; Gutiérrez-Gil et al. 2007) (Tableau 5, Rupp et al. 2010). Depuis 2010, de nouveaux projets nationaux et européens (SheepSNPQTL, 3SR : Sustainable Solutions for Small Ruminants, http://www.3srbreeding.eu/Home.aspx) sont en cours en France, Espagne et Italie, dans trois races ovines locales, pour rechercher de nouveaux QTL en utilisant la puce SNP 50k de cette espèce (ovine SNP Beadchip Illumina®). Ces projets s'intéressent principalement à la recherche de QTL associés aux maladies (parasitose et mammites) et à la reproduction.

Certains QTL sont spécifiques à une race, d'autres à un pathogène et d'autres encore à un phénotype particulier, ce qui explique le grand nombre de QTL détectés pour la résistance aux mammites (Rupp et al. 2010).

Tableau 5 : QTL pour la résistance aux mammites (SCS) chez les brebis laitières (revue de Rupp et Foucras 2010)

OAR	Trait	Position (cM)	Corresponding BTA region (cM)	Significance	Reference
6	SCS (L2)	80	BTA6 (65)	*	Rupp *et al.* (2003)[a]
	SCS	84	BTA6 (70)	*	Rupp (unpublished data)[b]
12	SCS (L3)	6	BTA16 (13)	**	Rupp *et al.* (2003)[a]
13	SCS (L1)	28	BTA13 (25)	*	Rupp *et al.* (2003)[a]
14	SCS	67	BTA18 (50)	*	Rupp (unpublished data)[b]
16	SCS	24	BTA20 (20)	*	Rupp (unpublished data)[b]
18	SCS (L1)	110	BTA21 (90)	*	Rupp *et al.* (2003)[a]
	SCS	72	BTA21 (60)	*	Rupp (unpublished data)[b]
20	SCS	103	BTA23 (70)	**	Gutierrez-Gill *et al.* (2007)[c]

Le but ultime de la recherche de QTL est d'identifier la mutation causale responsable du phénotype observé. Jusqu'à présent pour la résistance aux mammites, une seule mutation causale a été complètement caractérisée. Il s'agit d'un polymorphisme sur le gène FEZL (*forebrain embtyonic zinc finger-like*) localisé sur le chromosome BTA22 (gène situé sur la région équivalente ovine : OAR1) dans une zone QTL associée au SCS et qui contrôle l'expression de cytokines (Sugimoto et al. 2006).

Des résultats prometteurs sont attendus des nouvelles techniques de génotypage à haut débit et de l'utilisation du déséquilibre de liaison pour établir des cartographies très fines des QTL et découvrir des mutations causales. Mais même si les mutations causales ne sont pas détectées, l'information des QTL peut être directement utilisée en sélection si les marqueurs sont suffisamment proches. Les nouvelles puces (Infinium Bovine SNP50 BeadChip d'Illumina ou son équivalent chez l'ovin) représentent un outil précieux. Chez les caprins une puce 50k est en cours de construction (INRA, International Goat Genome Consortium).

3.2.4.3 Utilisation de l'information moléculaire

Les QTL associés aux SCS dans les races laitières bovines en France ont été intégrés dans un premier programme de sélection assisté par marqueur (SAM) (Fritz et al. 2008). Les jeunes taureaux ont été évalués sur les index classiques ainsi que sur l'information apportée

par les marqueurs moléculaires et les informations sur ascendance (performances des apparentés). Ainsi la valeur génétique prédite est plus précise qu'avec la seule information sur ascendance. L'objectif de la SAM était d'utiliser l'information moléculaire disponible très précocement dans la vie du reproducteur, de façon à diminuer les coûts des schémas de sélection pour au moins une efficacité équivalente en terme de progrès génétique.

Ensuite, la création de la puce SNP bovine 50K a permis d'engager un nouveau programme de cartographie fine des QTL connus, ainsi que la détection de nouveaux QTL (Fritz et al. 2008). Ce projet a permis d'identifier des marqueurs SNP en déséquilibre de liaison avec les QTL, ce qui simplifie l'intégration de l'information moléculaire dans l'évaluation précoce des reproducteurs. Ainsi, un second programme SAM a démarré en 2008 avec l'utilisation de ces résultats et le génotypage en routine des jeunes animaux sur les 54000 marqueurs SNP couvrant le génome bovin. Les progrès génétiques gagnés par l'utilisation de l'information moléculaire n'ont pas encore été mesurés. Chez les ovins, l'information moléculaire devrait être prise en compte une fois qu'elle sera connue et fiable.

Les progrès technologiques en termes de génotypage et de cartographie de génome permettent de considérer l'ensemble des gènes impliqués dans la variabilité génétique d'un caractère d'intérêt par des marqueurs moléculaires. La sélection génomique repose sur l'estimation de l'effet des marqueurs sur des caractères d'intérêt, qui est établie dans une population de référence. Puis ces modèles de prédiction sont appliqués à la jeune génération de reproducteurs afin d'indexer cette population avant de connaître les performances de ces reproducteurs. Ainsi la sélection génomique permet d'améliorer les schémas de sélection surtout pour les caractères qui sont peu héritables comme les SCS ou les MC, car elle permet d'accélérer le processus de sélection des reproducteurs (index précis et précoces) avant les résultats de performance des jeunes animaux. Toutefois, il est important de ré-estimer régulièrement les effets des marqueurs sur les performances des animaux les plus jeunes, sans quoi la précision de l'estimation « sélection génomique » diminue rapidement au cours des générations. Chez les ovins et les caprins des programmes sont en cours pour évaluer la faisabilité et les modalités de la sélection génomique dans ces espèces à partir de populations de référence de taille suffisante.

En France, la sélection basée sur les index SCS est opérationnelle chez les principales races laitières bovines et ovines et à l'étude chez les races caprines. Des diminutions des SCS et de la fréquence des IMI sont attendues. L'utilisation de l'information moléculaire des QTL en SAM peut améliorer l'efficacité de la sélection. Toutefois le nombre important de QTL détectés confirme la nature complexe et polygénique de la résistance aux mammites et rend plus difficile la mise en place de la SAM. Actuellement la sélection génomique qui prend en compte l'intégralité de l'information aux marqueurs est prometteuse. Mais pour sa bonne efficacité, il est important de réévaluer régulièrement les liens entre les SNP et les phénotypes.

De plus, la sélection sur les index ou sur des marqueurs moléculaires fonctionne comme une « boîte noire » car les mécanismes sélectionnés ne sont pas connus. Une meilleure connaissance de la base génétique du caractère permettrait de mieux comprendre et évaluer les mécanismes en jeu lors de la sélection sur les SCS ou les MC, ces caractères étant indirects et sans doute imparfaits. Elle permettrait aussi de mieux évaluer les conséquences de cette sélection à long terme et d'appréhender une dynamique hôtes-agents pathogènes. La recherche de QTL associé à la résistance aux mammites pourrait permettre d'identifier des mutations ou des gènes candidats, ce qui permettrait une sélection directe plus efficace et plus durable que la SAM ou la sélection génomique. La recherche de QTL pourrait éventuellement être appliquée à d'autres phénotypes que les SCS. Mon travail de thèse s'inscrit dans cette

démarche de mieux connaître les mécanismes de réponse des ruminants laitiers aux IMI, en utilisant des nouveaux outils de la génétique moléculaire fonctionnelle.

4 Objectifs de la thèse

Comme nous l'avons vu précédemment, les IMI constituent une pathologie majeure en élevage laitier. Par ailleurs la sélection opérée à partir des années 1970 jusqu'à nos jours pour une meilleure productivité laitière s'est accompagnée d'une augmentation de la sensibilité aux mammites chez les bovins avec de fortes conséquences économiques (diminution du volume de lait, pénalité sur le prix du lait vendu, traitement des animaux infectés, prévention…). Cette dégradation de la santé de la mamelle a conduit à considérer les IMI dans les objectifs de sélection des races laitières. Les CCS sont les témoins à la fois de la présence d'une infection et de la présence d'une réponse inflammatoire plus ou moins intense. Ainsi, une mesure des CCS sur un rythme mensuel est un très bon indicateur de la présence d'une IMI.

En France, les objectifs reposent principalement sur une diminution des CCS et récemment, chez les bovins uniquement, sur la prise en compte des MC. L'indexation sur les SCS a commencé en 1997 pour les bovins laitiers et en 2002 pour les ovins laitiers. Elle commence à donner de bons résultats car l'index SCS des jeunes reproducteurs s'améliore légèrement (+0,5 entre 2001 et 2003 chez les bovins).

Chez les bovins, la détection de QTL associés aux MC ou aux SCS a permis de compléter la sélection sur l'index SCS par une SAM. Les avancées technologiques du génotypage et les baisses de coût ont permis d'envisager une sélection génomique, c'est-à-dire une sélection qui prend en compte les déséquilibres de liaison de dizaines de milliers de marqueurs avec les QTL. La sélection génomique a le fort avantage de permettre une sélection précise et précoce sur des caractères qui ont des héritabilités faibles, voire très faibles comme les SCS ou les MC. Des études sont en cours pour prendre en compte ces mêmes critères en élevage ovin laitier, principalement dans la race Lacaune.

Cependant, la sélection génétique quantitative classique ou avec des marqueurs moléculaires, pour une diminution des SCS, repose sur une « boîte noire ». En effet à l'exception d'un QTL associé au SCS dont le rôle a été détaillé (Sugimoto et al. 2006), les mécanismes génétiques de résistance aux mammites ne sont pas connus. Ainsi, la sélection ne considère surement pas la diversité des agents pathogènes responsables de mammites ni toute la complexité du caractère de résistance.

L'étude bibliographique au chapitre I a montré que de nombreuses informations sur la réponse des différents types cellulaires (CSL, CEM et plus récemment macrophages) à des infections principalement à *S. aureus* et *E. coli* sont disponibles. En revanche ces analyses comparent généralement des échantillons sains et à des échantillons infectés ou élaborent des cinétiques de réponse aux infections, mais ne prennent pas en compte la variabilité de la réponse de l'hôte.

C'est pourquoi des scientifiques de l'INRA de Toulouse ont mis au point un protocole de sélection divergente basée sur les SCS depuis 2003. Même si les bovins occupent une place dominante avec trois races principales en France (Prim'Holstein, Normande et Montbéliarde), un modèle ovin a été choisi. Les ovins ont l'avantage d'être proches phylogénétiquement des bovins avec des physiopathologies assez comparables, même si la fréquence des MC est nettement plus faible chez les ovins. Ainsi les résultats obtenus chez les ovins peuvent être extrapolés, au moins en partie, aux bovins. De plus, la durée des intervalles entre générations chez les ovins est plus courte et à nombre d'animaux identiques, leur

élevage est moins coûteux (taille plus petite des bâtiments, quantité moindre d'aliments consommés,…) que chez les bovins, ce qui a favorisé le choix des ovins comme espèce modèle.

Ce protocole de sélection divergente a permis de générer deux lignées de brebis Lacaune, une avec des SCS élevés et une autre avec des SCS plus faibles. Les objectifs précis de ce protocole étaient multiples :

1- apprécier les conséquences d'une sélection sur les SCS sur la capacité de la mamelle à répondre aux infections ;
2- déterminer les mécanismes régulant la réponse immunitaire et inflammatoire ;
3- connaître les gènes ou les régions chromosomiques impliqué(e)s dans la sélection sur les SCS ;
4- savoir si la sélection intense sur les SCS peut provoquer un risque accru de sensibilité à l'infection.

Mon travail de thèse s'inscrit principalement dans les objectifs 1, 2 et 3 de ce protocole. Ainsi, les objectifs de mon travail de thèse étaient :

- de caractériser les gènes et mécanismes mis en place lors d'une infection staphylococcique dans les deux lignées de brebis par des analyses d'expression des gènes à l'aide de la technologie microarray ;
- de comparer les résultats obtenus au sein de chaque lignée pour identifier les conséquences de la sélection sur les SCS ;
- d'identifier des polymorphismes de l'ADN responsables des (ou de certains) mécanismes de résistance.

Notre modèle reposant sur des ovins, il n'était pas pertinent d'étudier la réponse à *E. coli* qui est un agent pathogène très peu fréquent chez la brebis (paragraphe 1.2) et nous nous sommes concentrés sur la réponse à *S. aureus*.

Pour caractériser les gènes et mécanismes de réponse des brebis à des infections, nous avons élaboré trois études différentes. Tout d'abord, nous avons étudié *in vivo* la réponse des **cellules somatiques du lait** (**CSL**), principalement composées de neutrophiles, après inoculation de *S. epidermidis* et de *S. aureus* (Chapitre III, Partie 1). Nous avons choisi ces deux espèces bactériennes, car elles sont principalement responsables de mammites subcliniques et cliniques chez les ovins, et qu'elles permettent donc d'étudier la réponse des hôtes en interaction avec un spectre plus divers d'agents pathogènes. Ensuite, nous avons étudié les lignées divergentes *in vitro* à travers deux autres types cellulaires, supposées jouer un rôle dominant, i) nous avons choisi les **cellules dendritiques** (**CD**) pour leur rôle central dans l'immunité, avec leurs capacités de détecter les antigènes et de transmettre l'alerte aux autres cellules du système immunitaire (Chapitre III, Partie 2), ii) nous nous sommes intéressés aux **cellules épithéliales mammaires** (**CEM**) car elles forment une barrière physique entre la lumière et les tissus de la glande mammaire et peuvent sécréter des cytokines chimio-attractantes pour diverses cellules (Chapitre III, Partie 3). Ensuite, une méta-analyse de ces trois jeux de données a permis de confirmer les hypothèses qui avaient été formulées dans chaque analyse individuelle, et d'en générer de nouvelles. Elle a aussi permis d'établir une liste de mécanismes et de gènes candidats fonctionnels pour déterminer l'origine génétique de la différence entre lignées. Cette synthèse est présentée dans la Partie 4 du Chapitre III.

Pour compléter l'étude génétique des lignées, nous avons réalisé des études du polymorphisme de l'ADN sur ces animaux (Chapitre III, Partie 5). Dans un premier temps

nous avons étudié séparément les deux lignées de brebis pour essayer de valider ou découvrir de nouvelles zones chromosomiques qui jouent un rôle dans la sélection sur les SCS. Nous nous sommes aussi concentrés sur un deuxième phénotype, la présence d'abcès mammaires pour lequel nous possédions un phénotypage fin des animaux. Ensuite les résultats des analyses fonctionnelles et positionnelles ont été confrontés pour mettre en évidence les principales caractéristiques des brebis de la lignée résistante et des brebis de la lignée sensible aux IMI.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Dans ce deuxième chapitre, je vais commencer par présenter les particularités biologiques des brebis sur lesquelles j'ai travaillé en expliquant le protocole de génération de deux lignées divergentes de brebis sélectionnées sur le SCS. Je vais montrer les principaux résultats en infections naturelles et expérimentales déjà connus avant le début de ma thèse. Ensuite, je vais présenter les principaux outils qui permettent de mettre en évidence des différences d'origine génétique entre les deux lignées de brebis. Je vais principalement développer les études du transcriptome avec la puce à ADN et dans une moindre mesure les études du polymorphisme de l'ADN. Ce chapitre n'a pas pour vocation de donner les éléments précis de méthodologie qui permettraient de reproduire les expériences (ces données étant présentées dans les parties « Matériel et Méthodes » de chaque partie du Chapitre 3), mais de faire un état de l'art sur les différentes approches.

1 Un modèle d'étude original : les lignées divergentes

Avec l'utilisation de plus en plus répandue du SCS en sélection chez les ruminants laitiers des questions ont émergé et ont conduit des chercheurs de l'INRA de Toulouse à mettre au point une sélection divergente de ruminants basée sur les SCS afin de connaître les conséquences à long terme d'une telle sélection. Un modèle animal ovin a été choisi car l'élevage d'ovins est moins coûteux que celui de bovins et que la réponse aux IMI est proche chez les trois principaux ruminants laitiers (bovin, ovin, caprin), même si la fréquence des MC est moindre chez les ovins.

1.1 Protocole de sélection divergente

1.1.1 Production des brebis des lignées divergentes

Des brebis de race Lacaune ont été procréées au domaine expérimental INRA de La Fage (UE321 Roquefort). Le protocole a consisté en une sélection divergente sur une génération basée sur les index SCS des parents (Rupp et al. 2009). La première cohorte a été créée en 2004.

Pour la production des lignées divergentes, deux groupes de six à sept béliers testés sur descendance, provenant des deux unités de sélection Confédération Générale de Roquefort et Ovitest, et présentant des index SCS extrêmes sont choisis chaque année. Ce choix se fait annuellement depuis 2003 suite à une indexation (Rupp et al. 2009; Allain et al. 2010). Les béliers pères des brebis CCS+ ont des index SCS négatifs (-1,96 en moyenne), tandis que les béliers pères des brebis CCS- ont des index SCS positifs (1,43 en moyenne). Les béliers sont aussi choisis pour avoir des index précis (coefficients de détermination 0,85 en moyenne) et des valeurs de l'index du lait positives et équivalentes.

Ces mâles sont accouplés par insémination artificielle(IA) avec les brebis de l'UE de La Fage pour produire deux groupes de filles avec des CCS respectivement élevées (CCS+) et faibles (CCS-). Une intensité de sélection moindre est appliquée aux mères, qui sont réparties dans deux groupes de même effectif d'après leur « cellules ». Depuis 2007, des brebis de 2ème génération sont également produites.

Les protocoles successifs de lignées divergentes de première génération entre 2005 et 2009 ont abouti à la mise en lactation de 191 brebis CCS+ et de 210 brebis CCS- (Allain et al. 2010).

1.1.2 Des différences de concentrations de cellules somatiques

Pour caractériser les brebis des deux lignées divergentes, plusieurs mesures ont été effectuées. Elles ont consisté à :

- mesurer les caractères laitiers et les CCS de toutes les brebis pendant l'allaitement puis toutes les 3 semaines dans le cadre du contrôle laitier, soit 9 fois entre les mois de janvier et de juin, et 7 fois pour les primipares, leur lactation étant plus courte avec une IA un mois après les multipares ;
- enregistrer les cas de MC ;
- réaliser des examens cliniques des mamelles par inspection et palpation pour détecter la présence d'abcès à quatre reprises par lactation ;
- analyser les bactériologies du lait : une fois au moment de la mise bas et trois fois pendant la lactation (hors période d'allaitement).

Les lignées créées ont permis d'obtenir une divergence de 1,75 point de score, ce qui correspond à 3 écart-types génétiques du SCS et à plus du double de la moyenne géométrique des CCS entre les lignées CCS+ et CCS- pour les lactations de rang 1 à 3 dès la première génération. Ce résultat s'illustre par des moyennes brutes égales à 279 000 cellules/ml dans la lignée CCS- et à 1 209 000 dans la lignée CCS+ (Allain et al. 2010) (Tableau 6).

Tableau 6 : Caractéristiques des brebis CCS+ et CCS- (Lactations 1 à 3, Traite du matin, 2005 à 2009) (Allain et al. 2010)

	Lignée CCS+	Lignée CCS-
Effectif	191	210
CCS (*1000 c/ml)	1209 (±2955)	279 (±1289)
SCS	4,4 (±2,4)	2,6 (±1,7)

1.2 Résistance aux infections intra-mammaires dans les lignées divergentes

1.2.1 Suivi d'infections naturelles

Comme nous l'avons vu précédemment, la prévalence des mammites subcliniques est généralement élevée (Tableau 6) ; il en est de même dans le troupeau de l'unité expérimentale. Les brebis CCS+ et CCS- sont donc exposées en continu à des agents responsables de mammites.

Le suivi des brebis CCS+ et CCS- pendant 5 années a montré qu'une sélection sur les SCS est favorable à la résistance aux IMI naturelles (Tableau 7) (Rupp et al. 2010; Allain et al. 2010). En effet, même si peu de cas de MC sont survenus, la plupart est apparue chez les brebis CCS+ (n=25 cas sur 31, fréquence globale de 7%). De plus, l'incidence des mammites chroniques associées à des abcès détectés par l'examen mammaire était significativement supérieure chez les brebis CCS+ que chez les brebis CCS- (36% contre 9% de brebis affectées).

Les analyses bactériologiques du lait montrent que la prévalence des IMI est plus élevée chez les brebis CCS+ que chez les brebis CCS- (OR=3,3[2,5-4,4]), en particulier au moment de la mise bas (OR=7,0[4,2-11,7]) (Rupp et al. 2010; Allain et al. 2010). De plus, l'identification précise des agents pathogènes a été effectuée par bactériologie sur les échantillons de la première cohorte (Rupp et al. 2009). Ainsi, la durée des infections est plus

longue chez les brebis CCS+ que chez les brebis CCS-. Les staphylocoques sont les agents pathogènes majeurs, particulièrement *S. auricularis* avec 20,8% des échantillons de lait positifs chez les brebis CCS+ et 5% chez les brebis CCS-. Les prévalences de *S. aureus* et *S. epidermidis* sont respectivement de 1,2% et 0,3% chez les brebis CCS+ et de 0,6 et 0,4% chez les brebis CCS- (Rupp et al. 2009).

Tableau 7 : Concentrations de cellules somatiques et fréquences des mammites chez les brebis CCS+ et CCS- (Allain et al. 2010)

	Lignée CCS+		Lignée CCS-	
	N	Moyenne	N	Moyenne
Mammites cliniques (762 L1-L3)	355	25 cas	407	6 cas
Abcès (au moins 2 palpations)				
% de L1-L3 affectées	323	36 %	382	9 %
Bactériologies du lait (2005-2007)				
% de positif sur tous les échantillons[1]	1133	46 %	1294	23 %
% de positif à la mise bas	218	54 %	248	22 %

[1] échantillons prélevés à la mise bas, pendant l'allaitement et lors de 3 contrôles laitiers espacés de 6 semaines

La sélection divergente sur les SCS est équivalente à environ 30 ans de sélection suivant l'objectif de sélection des ovins laitiers proposé pour la race Lacaune en 2006. Tous les résultats sont publiés dans l'article décrivant les lignées (Rupp et al. 2009). Les observations en ferme ont confirmé le fait que les brebis sélectionnées pour des SCS élevés sont plus sensibles aux infections mammaires que les brebis sélectionnées pour des SCS faibles.

1.2.2 Suivi d'infections expérimentales

Pour caractériser les différences de réponse aux IMI des brebis CCS+ et CCS- des infections expérimentales ont été réalisées à l'école nationale vétérinaire de Toulouse (ENVT). Ces expériences, basées sur un faible nombre d'animaux ont permis d'évaluer la réponse des brebis CCS+ et CCS- dans des conditions contrôlées d'infection (agent pathogène, quantité inoculée, début de l'infection).

Sept brebis CCS- et sept brebis CCS+ de la première cohorte ont été choisies car elles n'avaient aucun signe préexistant d'IMI (SCS faible, bactériologie du lait négative). Ces brebis n'avaient aucun lien parental direct entre elles. Elles ont été inoculées expérimentalement par *S. epidermidis* en 2005, puis par *S. aureus* en 2006. Ces deux staphylocoques sont les principaux agents responsables de mammites respectivement subcliniques et cliniques, voire chroniques chez les ovins. Les brebis ont été suivies pendant les 10 jours suivant l'inoculation. Les résultats acquis avant ce travail de thèse ont été synthétisés par Rupp al. (2010) et en partie présentés dans Bonnefont et al. (2011).

En résumé, après chacune des inoculations, les SCS et les profils d'excrétion bactérienne (Figure 3) ne sont pas significativement différents sur l'ensemble de la période observée. En revanche, après inoculation de *S. aureus,* les excrétions bactériennes dans le lait étaient plus élevées sur la période 24-48h chez les brebis CCS+ que chez les brebis CCS-

(μ_{CCS+}=13,7 (1,7 écart-type) et μ_{CCS-}=12,2 (2,1), p=0,048) et après inoculation de *S. epidermidis,* les excrétions bactériennes avaient tendance à être plus élevées à 48h chez les brebis CCS+ que chez les brebis CCS- (μ_{CCS+}=3,9 (4,6) et μ_{CCS-}=0,86 (0 ;21), p=0,27) (Bonnefont et al. 2011).

D'autre part, des palpations mammaires ont été effectuées au moment de la traite du matin et du soir. Les principaux résultats ont montré que des abcès mammaires étaient détectés chez quatre brebis CCS+ et une seule brebis CCS- et que le score moyen de l'examen clinique (index synthétique du nombre et de la taille des abcès mammaires) était plus élevé chez les brebis CCS+ que chez les brebis CCS- après inoculation de *S. epidermidis* ou de *S. aureus* (Figure 3).

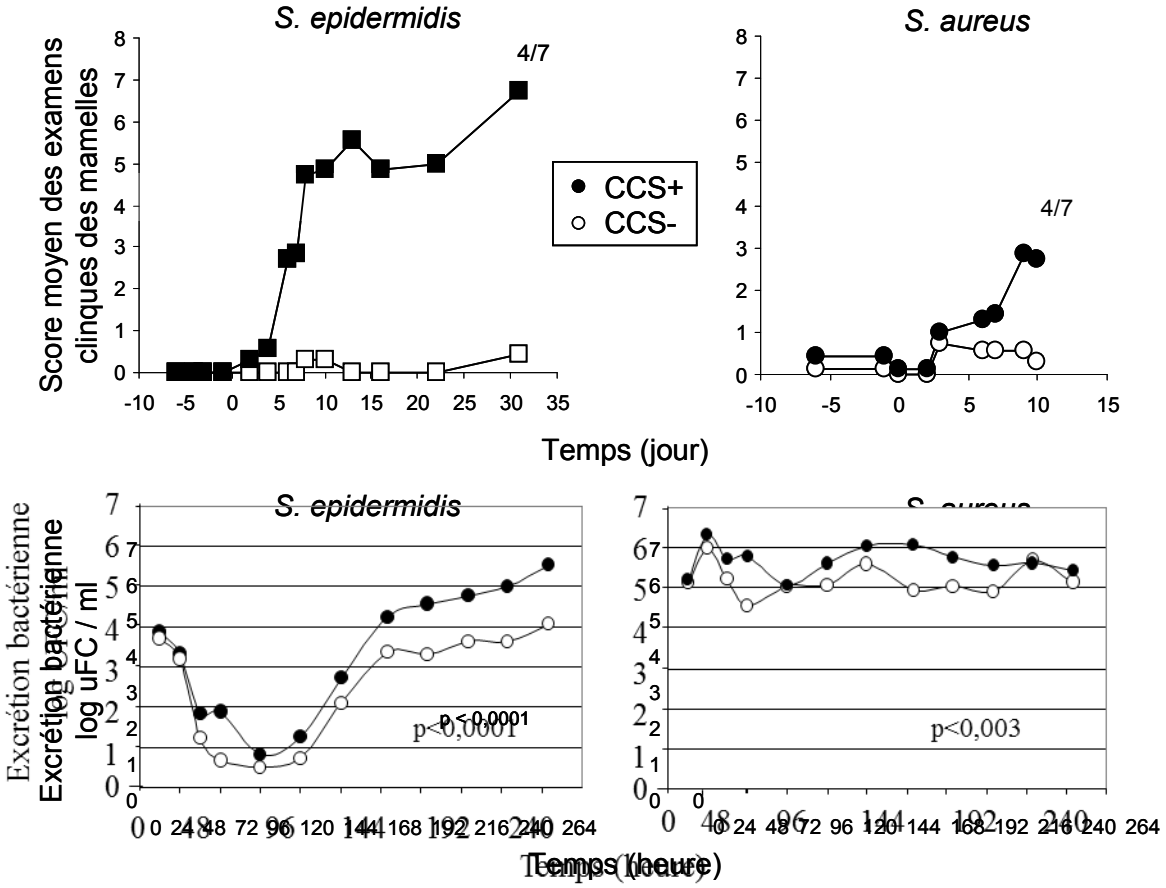


Figure 3 : Score moyen des examens cliniques des mamelles et excrétions bactériennes (log uFC / ml) après inoculation de 10^3 ufc *S. epidermis* et de *S. aureus*. Les p-values correspondent à l'effet lignée.

Le suivi clinique des brebis après infection expérimentale par deux staphylocoques confirme les observations faites dans l'UE en situation d'infection naturelle. En effet, l'ensemble des résultats montre une sensibilité aux IMI supérieure chez les brebis de la lignée avec des CCS élevées que chez celles de la lignée avec des CCS faibles.

En conclusion, il semble que les brebis CCS- possèdent certaines aptitudes qui leur permettent de limiter la multiplication bactérienne en cas d'IMI. Nous pouvons également proposer l'hypothèse que dans un troupeau avec des brebis CCS+, la contamination des brebis entre elles est plus importante que dans un troupeau de brebis CCS- car l'excrétion bactérienne est supérieure.

2 Analyses des différences d'origine génétique

A la suite de la description des ressources animales, je vais présenter les outils qui permettent d'analyser les différences d'origine génétique. Ces différences peuvent s'appréhender à trois échelles. La première échelle est le support de **l'information génétique** : l'**ADN** (acide désoxyribo nucléique). Il a la propriété d'être **identique** dans toutes les cellules somatiques d'un organisme vivant. La deuxième exploration repose sur l'étude du **transcriptome**, c'est-à-dire de l'ensemble des gènes transcrits en **ARNm** (Acide RiboNucléique messager). Le transcriptome d'une cellule dépend de nombreux facteurs : de sa spécialisation (musculaire, immunitaire, neurone, ...), de son état physiologique, de la présence d'hormones, de nutriments, de cytokines, de pathogènes ... Une troisième échelle serait l'étude du **protéome**, c'est-à-dire de l'ensemble des **protéines** d'une cellule. Comme précédemment pour le transcriptome, le protéome dépend fortement du type de cellule étudié et des conditions environnantes. Ces trois niveaux de l'information génétique (ADN, ARNm et protéines) interagissent dans une cellule et apportent des informations complémentaires. Au cours de ma thèse, j'ai principalement travaillé sur le transcriptome et j'ai aussi abordé l'étude de l'ADN génomique. Je ne décrirai les méthodes que de ces deux types de données.

2.1 L'analyse des gènes exprimés

On considère qu'il y a environ 20 à 30 000 gènes différents dans le génome ovin. Pour mesurer l'expression des gènes, il existe plusieurs approches. Une des principales approches est la **RT-qPCR** (transcription réverse et Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative). Cette approche permet de mesurer ponctuellement l'expression d'un gène. Or, dans une cellule, entre 3000 et 5000 gènes peuvent être transcrits en même temps. Ainsi pour étudier le transcriptome, il est intéressant d'utiliser un outil d'analyse de l'expression des gènes à haut débit : le **microarray** ou puce à ADN. Cette technique permet d'analyser simultanément des milliers de gènes. Une nouvelle approche basée sur la technologie de séquençage s'avère prometteuse : elle consiste à séquencer l'ensemble des molécules d'ARNm d'une cellule (**RNAseq**). Dans cette section, je présenterai brièvement la PCR et ses applications, je développerai plus en détail les analyses avec les microarrays.

2.1.1 Quelques méthodologies d'analyse

2.1.1.1 Quantification des ARN par réaction de polymérisation en chaîne

La RT-qPCR consiste à amplifier une séquence d'ADN à partir d'une amorce qui est spécifique au transcrit à mesurer. Elle repose sur des cycles de température précis qui déterminent l'enchaînement des étapes de **polymérisation** de la molécule d'ADN cible et de **dénaturation** de l'ADN double brin obtenu en ADN mono-brin. L'étape de fixation de l'amorce à l'ADN est déterminante pour l'efficacité de la réplication du transcrit. Les cycles de température du milieu de réaction sont bien contrôlés dans le thermocycleur, ce qui garantit l'efficacité de la RT-qPCR. Des marquages avec des fluorochromes permettent de quantifier les molécules d'ADN au cours du temps et donc de suivre l'amplification des transcrits. L'intensité lumineuse mesurée est proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisée.

Le milieu de réaction contient :

- la séquence d'ADN à amplifier ;
- une ADN polymérase (enzyme capable de répliquer l'ADN, il s'agit souvent d'une TAQ polymérase : *Themophillus aquaticus*) ;
- des amorces d'ADN spécifiques à la séquence d'ADN à amplifier ;
- des bases azotées, qui seront assemblées lors de la synthèse de nouvelles molécules d'ADN ;
- un intercalent (souvent du SYBR green) qui se fixe à l'ADN synthétisé et permet de mesurer la quantité d'ADN synthétisé.

L'amplification de l'ADN n'est pas linéaire sur l'ensemble des cycles, mais elle est souvent exponentielle, ainsi on représente souvent le logarithme de la quantité d'ADN en fonction des cycles (**Figure 4**). On utilise la valeur de la phase exponentielle (*ie,* du milieu de la phase linéaire sur le graphique en logarithme) pour comparer les niveaux d'expression entre différents échantillons. Mais cette valeur en soi n'est pas très informative. Il faut normaliser ces valeurs entre les différents échantillons en référence à des gènes de ménage (*house keeping genes, HKG*) dont l'expression n'est pas affectée par l'état physiologique de la cellule/du tissu et par les conditions environnementales. Actuellement, on considère qu'il faut utiliser l'expression de plusieurs gènes de ménage (souvent 4 ou 5) et exprimer la quantité d'ADN d'un gène d'intérêt en expression relative par rapport aux gènes de normalisation (Vandesompele et al. 2002).

Pour vérifier que la RT-qPCR est spécifique, la courbe de dissociation peut être tracée (**Figure 5**). Elle montre la température à laquelle les ADN double-brin se séparent en ADN monobrin. Si un seul pic est visible sur les courbes, la réaction est spécifique.

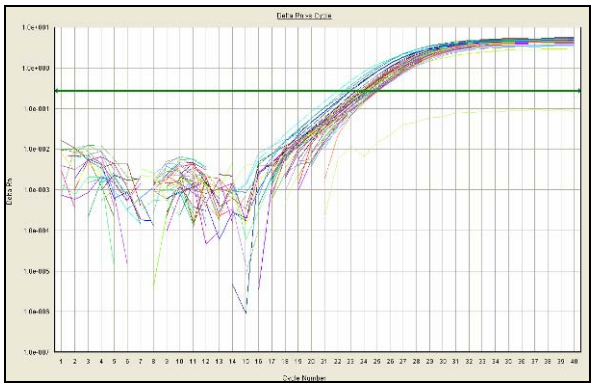


Figure 4 : Courbes de suivi de la quantité d'ADN au cours de la RT-qPCR. Exemple du gène de ménage RP19 pour les échantillons des cellules épithéliales mammaires.

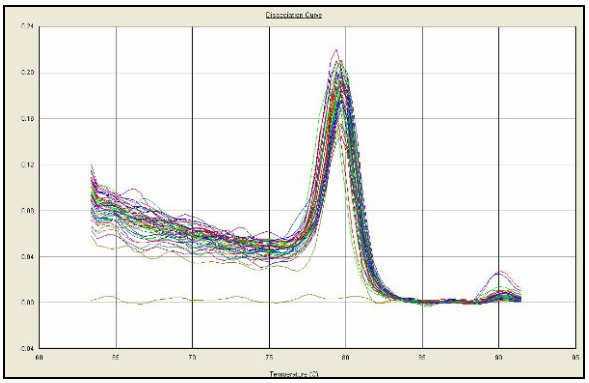


Figure 5 : Courbes de dissociation des ADN double brin en ADN monobrin pour le gène de ménage RP19 avec les échantillons des cellules épithéliales mammaires.

Pour appliquer cette réaction à des échantillons d'ARNm, il faut effectuer une première étape appelée transcription inverse (RT), elle permet de synthétiser un premier brin d'ADN à partir d'une molécule d'ARNm. La quantité d'ADN peut alors être mesurée par qPCR.

Actuellement, il existe une nouvelle technologie Biomark® commercialisée par la société Fluidigm qui permet de mesurer de nombreux échantillons simultanément (plaque de 48*48 ou 96*96) et de réduire fortement les volumes de réaction (6.7 nl). Cette technologie permet de gagner du temps de réaction et d'économiser de grands volumes de réactifs.

2.1.1.2 Quantification des ARN par puce à ADN

2.1.1.2.1 Nature et définitions d'ue puce à ADN

Spot : zone de la puce d'ADN sur laquelle sont fixés des millions de sondes identiques.

Sonde (*probe*) : séquence d'ADN connue fixée sur l'emplacement d'un spot de la puce à ADN.

Les microarrays sont des outils qui permettent d'étudier l'expression de plusieurs centaines, voire milliers de gènes simultanément.

Nature des microarrays

Les microarrays peuvent se présenter sous forme de lame de verre ou de membrane de nylon. Les microarrays sur lame de verre sont les plus répandus, car leur coût est relativement faible, ils sont stables à de fortes températures, peuvent être lavés et ré-hybridés et ont un bruit de fond en fluorescence très faible (Cheung et al. 1999).

Ils sont spécifiques à une espèce particulière, car leurs sondes proviennent de cette espèce. L'avantage des puces à ADN à haute densité vient de leur caractère « **pangénomique** », ce qui signifie que la majeure partie des gènes d'un organisme est représentée sur cette puce. Par conséquent, lorsqu'on utilise cette puce, on fait peu d'hypothèse *a priori* sur les gènes exprimés dans une cellule (Sobek et al. 2006).

Plusieurs techniques de dépôt des sondes

Il existe deux grands types de conception des microarrays. Initialement, les sondes étaient synthétisées puis imprimées sur chaque spot (*printed microarrays*). Actuellement, la plupart des microarrays contiennent des oligonucléotides qui sont synthétisés *in situ* sur les spots (*in situ-synthesized oligonucleotide microarrays*) (Miller et Tang 2009). Cette seconde technique a permis d'améliorer la performance des puces à ADN et de densifier énormément le nombre de spots sur la puce jusqu'à atteindre des centaines de milliers de spots sur une même lame (technologie Affymetrix). Les sondes d'ADN sont alors monobrins et n'ont pas besoin d'une étape de dénaturation. De plus, grâce à la technique de synthèse *in situ*, toutes les sondes d'une puce ont la même longueur et la même température de fusion, ce qui permet une hybridation plus homogène à une température donnée (Barrett et Kawasaki 2003).

Diverses longueurs de sondes

Avant la disponibilité des séquences d'un génome, les gènes exprimés étaient identifiés par des analyses de séquence d'ADN complémentaire (ADNc). Ces ADNc étaient insérés dans des plasmides puis amplifiés par PCR. Puis ils étaient fixés sur la lame soit de façon électrostatique (chaleur ou UV), soit par des liaisons covalentes en 5' (Barrett et Kawasaki 2003). L'utilisation d'ADNc permet une très bonne spécificité d'hybridation même sans connaître la séquence nucléotidique. Mais cette technique était coûteuse pour l'obtention de milliers de gènes et avait l'inconvénient d'avoir un bruit de fond élevé.

Avec la technique de synthèse *in situ,* la taille des séquences d'oligonucléotides a diminué. On différencie les séquences courtes qui contiennent une vingtaine de nucléotides (25 chez Affymetrix), des séquences plus longues de 50 à 80 bases (Barrett et Kawasaki

2003). Avec les séquences courtes, la spécificité d'hybridation est un peu plus faible car plusieurs cibles peuvent s'hybrider sur une même sonde ; aussi plusieurs sondes différentes sont nécessaires pour évaluer l'expression d'un même transcrit (sur les microarrays Affymetrix, chaque transcrit est représenté par 11 à 20 sondes) ce qui permet d'éliminer les problèmes de spécificité (Barrett et Kawasaki 2003). Lorsque les séquences sont un peu plus longues, la spécificité d'hybridation est meilleure. Il semble que des oligonucléotides de 60 mères soient un bon compromis entre spécificité et sensibilité (Hughes et al. 2001) et il a été montré qu'avec des oligonucléotides de 50 mères la spécificité d'hybridation est aussi bonne qu'avec des ADNc (Kane et al. 2000).

La puce ovine Agilent : ses caractéristiques

Au cours de ma thèse, j'ai utilisé la puce Agilent ovine 15K (019921). C'est une lame dédiée à l'espèce ovine. Elle contient 8 microarrays identiques avec 15 208 spots. Parmi ces spots, il y a 200 spots de contrôle et environ 12 000 gènes, soit environ 50 à 70% de la totalité des gènes ovins, dont 8 000 seulement sont actuellement annotés (Casel et al. 2009).

La technologie *inkjet printing process* utilisée pour synthétiser *in situ* les sondes confère une bonne reproductibilité à ce microarray. Les oligonucléotides comportent 60 nucléotides ; cette taille permet d'obtenir une bonne spécificité d'hybridation. Le nombre élevé de sondes permet d'évaluer l'expression d'environ un tiers des gènes de l'espèce ovine. De plus, la technologie sur lame de verre permet l'hybridation de 2 échantillons en parallèle sur le même microarray, ainsi à chaque hybridation d'une lame de 8 microarrays, 16 échantillons peuvent être analysés simultanément. La bonne qualité du dépôt des sondes donne la possibilité à l'utilisateur de dénaturer la première hybridation et d'en faire une seconde avec un autre échantillon. Toutes ces caractéristiques de la puce Agilent ovine ont contribué à notre choix de travailler sur ce microarray.

La facilité d'utilisation des microarrays et la quantité d'information obtenue par leur utilisation à un coût raisonnable a entraîné, dans les années 2000, une explosion du nombre de publications utilisant cette technique chaque année (Figure 6).

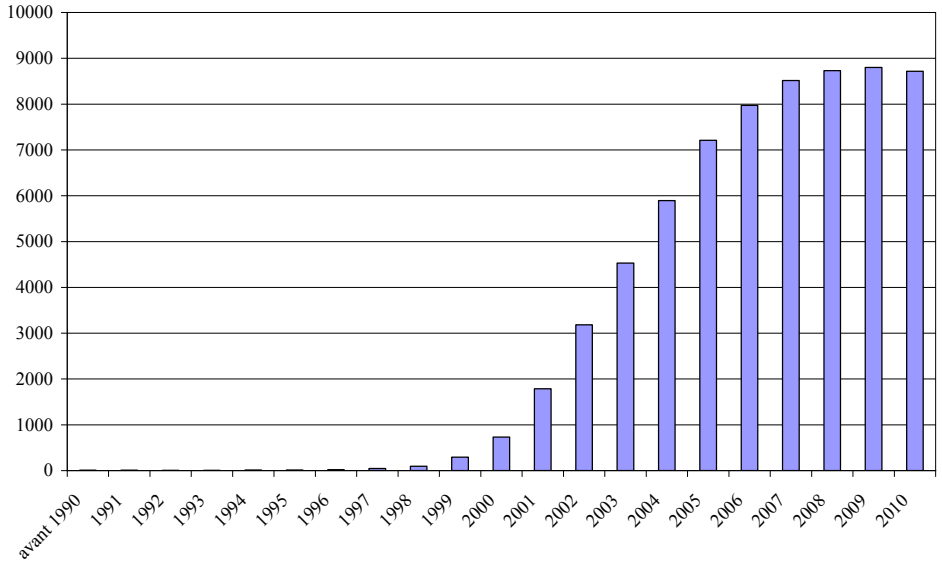


Figure 6 : Histogramme du nombre de publications utilisant la technologie microarray par an depuis 1990 (d'après the web of knowledge).

2.1.1.2.2 Hybridation des échantillons d'ARNm

Cible (**target**) : séquence d'ADNcopie d'un échantillon dont on veut mesurer l'expression des gènes.

Hybridation (**hybridisation**) : action qui conduit à un attachement spécifique entre une cible d'ADN provenant d'un échantillon et une sonde d'ADN fixée sur une puce à ADN dans des conditions expérimentales précises. Pour pouvoir s'hybrider ensemble, les séquences de la cible et de la sonde doivent être complémentaires.

Préparation de la cible

Une fois que les cellules d'intérêt sont isolées, leurs ARNm sont extraits. Ces ARNm sont amplifiés en ARNcopie qui constituent la **cible**. Il est important de vérifier la qualité des ARN avant l'hybridation (*RNA integrity number* : RIN) (Schroeder et al. 2006) afin de garantir la qualité des résultats. La cible est marquée soit par de la radioactivité (principalement ^{33}P), soit par un fluorochrome (technique la plus utilisée ; souvent Cyanine 3 –Cy3– et/ou Cyanine 5 –Cy5–).La cible est préparée selon un protocole expérimental standardisé, puis placée en incubation sur le microarray pour l'hybridation.

Habituellement, le microarray est spécifique de la cible. Toutefois, lorsqu'il n'existe pas de microarray spécifique à une espèce, il est possible de faire des hybridations hétérologues (Bar-Or et al. 2007), c'est-à-dire de choisir un microarray qui contient des sondes d'ADN d'une espèce différente. Il est alors important de choisir une espèce proche phylogénétiquement afin d'optimiser l'hybridation entre la sonde et la cible. Mais les résultats d'hybridation hétérologue sont mitigés (Bar-Or et al. 2007).

Hybridation spécifique de la cible sur la sonde

Les ADNc dont la séquence est complémentaire à celle d'une sonde s'hybride sur celle-ci. Puis un lavage du microarray permet d'éliminer les cibles non fixées. Une hybridation réussie entre une cible marquée et une sonde immobilisée engendre une augmentation de l'intensité de la fluorescence ou de la radioactivité sur un spot par rapport à un niveau environnant (bruit de fond) (Miller et Tang 2009).

Obtention du fichier de données

La lecture du microarray s'effectue avec un scanner (GenePix 4000B, Axon Instrument pour de la fluorescence ou MicroImagers, Biospace Mesures pour de la radioactivité). Elle permet de mesurer l'intensité du marquage de chaque spot. Des logiciels d'extraction d'image permettent de faire le lien entre l'image du scanner et les spots du microarray (Agilent's Feature Extraction, GenePix Pro par exemple). Outre l'intensité des spots, le signal à l'extérieur des spots est aussi mesuré pour pouvoir estimer le bruit de fond, qui correspond à l'hybridation non spécifique de la cible autour d'un spot.

Lorsque deux échantillons sont hybridés sur le même microarray (Agilent Technology®), le scanner lit l'intensité du marquage à deux longueurs d'onde et permet d'obtenir une valeur d'intensité pour chaque échantillon.

2.1.1.2.3 Nettoyage et normalisation des données

Afin d'améliorer la qualité des résultats obtenus par microarray, il est important d'identifier les sources de variabilité, de les contrôler lors de la phase expérimentale et de diminuer leur effet en filtrant et normalisant les données.

Sources de variabilité des analyses microarray

Pour valider les différences d'expression des gènes entre deux conditions, il faut s'assurer que la variabilité observée entre ces deux conditions ne provient pas d'autres sources que celle que l'on veut étudier. Il est donc important d'identifier ces sources de variabilité et de mettre en place un protocole expérimental qui permet de les contrôler.

Une première source de variabilité des données de microarray peut provenir du microarray lui-même avec des artéfacts lors de sa conception (au moment du dépôt des sondes surtout pour les ADNc ou lors de la synthèse des oligonucléotides surtout si elle a lieu avant le dépôt sur la lame). Cependant, la technologie de synthèse *in situ* des sondes a permis de bien améliorer ce défaut et actuellement la préparation des lames est bien plus constante, ce qui augmente la reproductibilité des lames. Des sources de variations peuvent aussi provenir de la cible, à cause de l'échantillonnage ou de la qualité des ARN. En effet, chaque étape de la préparation des cibles (purification des ARN, transcription inverse en ADNc, amplification éventuelle par PCR, marquage, hybridation des lames) représente une source de variabilité entrainant des artéfacts (Lee 2004). Il est important de vérifier la qualité des ARN et de n'hybrider que des ARN de bonne qualité (avec des valeurs de RIN proche de 9). L'efficacité de l'hybridation dépend aussi de nombreux facteurs : température, durée de l'incubation, lavage, fluorochrome utilisé, hybridations non spécifiques, conservation des échantillons, manipulateur, ... (Schuchhardt et al. 2000; Lee 2004). Ainsi, quelques différences peuvent exister pour un même échantillon hybridé sur deux microarrays. Lee (2004) rapporte aussi que les procédures d'analyse d'images peuvent engendrer de la variabilité, c'est pourquoi il est recommandé de ne pas modifier les paramètres du scanner lors de différentes prises de mesure.

Toutefois, la reproductibilité des analyses de microarray a été étudiée par hybridation de deux triplicats sur des puces avec 65 oligonucléotides et une faible variabilité a été mise en évidence entre les tripliquats, ce qui indique une bonne reproductibilité des processus de microarray (Lee et al. 2007).

Normalisation des données

Pour diminuer l'influence des différentes sources de variabilité, il est possible de normaliser les données brutes issues de la lecture du scanner avec des logiciels (R package LIMMA *Linear Models for Microarray Data*, GeneSpring®, par exemple). La première étape consiste à filtrer les données, c'est-à-dire à éliminer des spots pour lesquels l'intensité du marquage est très faible ou pas uniforme sur le spot, le bruit de fond (l'intensité de marquage autour des spots) est élevé, ou qui sont saturés (Figure 7 A et B et Figure 8 A et B).

L'analyse des microarrays repose sur le postulat que la majeure partie des gènes ne diffère pas d'une condition à l'autre. Ainsi la distribution des intensités sur l'ensemble des microarrays au cours d'une expérience doit être similaire. Pour les hybridations en double couleur, il existe un biais lié à l'incorporation des deux fluorochromes qui ont des

encombrements stériques et des intensités de fluorescence différente. Ces données sont généralement décrites par deux variables : **A** qui représente la moyenne des log des intensités rouges (Cy5) et vertes (Cy3) et **M** qui symbolise la différence des log.

$$A = \left(\log_2(Cy5) + \log_2(Cy3)\right)/2$$
$$M = \log_2(Cy5) - \log_2(Cy3)$$

Ces données sont représentées par des MAplot (Figure 8). Le biais entre Cy3 et Cy5 se traduit généralement par un excès de faibles valeurs pour la Cy3, ce biais est visible par le grand nombre de valeurs dans le carré inférieur gauche dans le MAplot tracé avec les données filtrées (Figure 8B). La fonction ***normalizeWithinArrays*** du package LIMMA (Smyth et Speed 2003; Smyth 2005) permet d'appliquer une fonction *loess* aux distributions des intensités des deux canaux pour rapprocher les distributions des canaux Cy3 et Cy5 et ainsi éliminer ce biais lié au marquage (Figure 7B et C et Figure 8B et C).

Ensuite, pour corriger tous les biais liés aux différences d'hybridation d'un microarray à un autre, la fonction ***normalizeBetweenArrays*** du package LIMMA (Smyth 2005) est bien adaptée. Elle permet par exemple d'imposer la même distribution empirique à tous les microarrays et tous les canaux (**method=quantile**) (Yang et Thorne 2003).

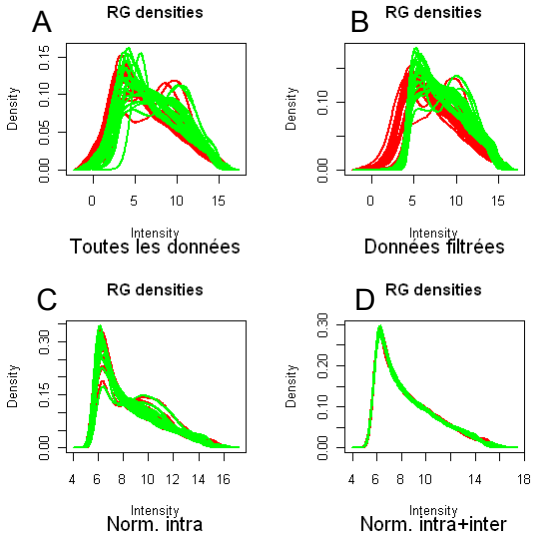


Figure 7 : Distribution des intensités de fluorescence de tous les spots d'un microarray selon la normalisation des données. Figure (A) : données brutes. Figures B : données filtrées. Figure C : données filtrées et normalisées (intra-lame loess) et Figure D : données filtrées et normalisées (intra-lame loess + inter lames Aquantile sans correction du bruit de fond).

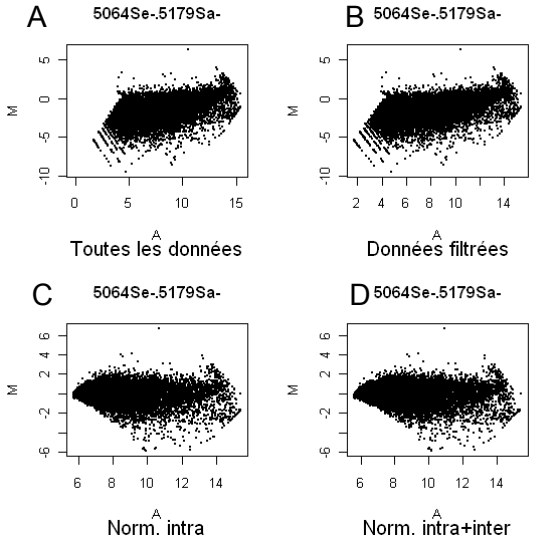


Figure 8 : MAplot des intensités de fluorescence selon la normalisation des données de microarray. Le A en abscisse correspond à la moyenne des intensités des deux fluorochromes et le M en ordonnée à la différence entre les intensités de Cy5 et de Cy3. Les lettres des figures sont explicitées dans la figure de gauche.

Reproductibilité des analyses de microarray

Nous venons de voir qu'il existe plusieurs types de microarray, que les échantillons peuvent être marqués de différentes façons, que les protocoles d'hybridation et de lecture des données sont variés, qu'il existe de nombreuses méthodes de traitement des données. Tout cela rend la reproductibilité d'une expérience difficile. Les membres du Microarray Gene Expression Data (MGED http://www.mged.org/) ont travaillé ensemble pour récapituler les données standards à fournir pour la publication de données de microarray dans le MIAME (Minimal Information About a Microarray Experiment, Brazma et al. 2001). Le MIAME est découpé en six grandes sections :

1- Le plan expérimental qui correspond à l'ensemble des hybridations ;
2- Le modèle du microarray avec description de chaque puce et de chaque élément (spot, contrôle) sur la puce ;
3- Les échantillons avec leur nature, leur extraction et leur marquage ;
4- Les hybridations avec les procédures et paramètres utilisés ;
5- Les mesures obtenues à partir des images avec les données brutes ;
6- Les méthodes de normalisation (description et valeurs normalisées obtenues).

Le MIAME propose que l'ensemble de ces informations soit déposé dans des bases de données publiques (Brazma et al. 2001), comme Array Express (http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/) ou GEO –Gene Expression Omnibus- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) (Ball et al. 2002). En 2009, Brazma est revenu sur les succès, les échecs et les défis du MIAME (Brazma 2009). La plupart des journaux demande actuellement que les expériences suivent le guide MIAME pour pouvoir être publiées. Plus de 10 000 études de microarray ont été déposées dans des banques de données publiques. Cependant la reproductibilité des études de microarray déjà publiées reste limitée. Ioannidis *et al.* (2009) ont ré-analysé 18 jeux de données de microarray publiées dans Nature Genetics entre 2005 et 2006. Ils n'ont réussi à reproduire que 2 analyses complètement, 6 partiellement ou avec des contradictions, et 10 n'ont pas pu l'être du tout. Ce faible nombre s'explique par des problèmes de disponibilité des données, des incohérences dues à des problèmes d'annotation et de traitements/analyses des données (Ioannidis et al. 2009). Ils concluent en disant que les efforts doivent être poursuivis, pour que toutes les informations nécessaires pour ré-analyser un jeu de données soient disponibles publiquement.

2.1.2 Etude de la variabilité biologique dans l'expression des gènes

Quelle que soit l'approche utilisée pour mesurer l'expression d'un gène, une fois que les données ont été préparées, le but est de comparer la quantité d'ARNm entre différentes conditions afin de mettre en relation l'expression de certains gènes et un phénotype d'intérêt. La mesure d'expression d'un grand nombre de gènes par rapport au nombre restreint d'échantillons biologiques pose des problèmes de dimension. Le but de l'analyse statistique est alors d'extraire une information pertinente concernant l'effet de différents facteurs sur l'état fonctionnel de la cellule ou du tissu. Il existe principalement trois stratégies applicables à l'analyse de données transcriptomiques ; i) des méthodes issues de la statistique exploratoire (ACP, positionnement multidimensionnel, classification), ii) de la modélisation (analyse de variance, modèles mixtes, tests), ou iii) de l'apprentissage (forêts aléatoires avec la recherche de gènes les plus discriminants). Après avoir testé ces méthodes sur un jeu de données, des statisticiens de Toulouse déclarent qu'il n'y a pas, a priori, de meilleure approche mais qu'il faut trouver la « bonne » stratégie associant exploration et modélisation, adaptée tant aux données qu'à l'objectif recherché (Baccini et al. 2005). Outre les différentes méthodes, il est

possible de faire varier différents paramètres ou d'adapter les analyses selon les besoins et la question biologique posée. Par exemple, l'analyse de variance (ANOVA) peut être effectuée soit gène par gène, soit par groupe de gènes ayant une variabilité homogène ou hétérogène.

Dans mon manuscrit, je ne développerai que les approches de modélisation de la recherche de gènes différentiels adaptées aux données de microarray et de qPCR. Puis je donnerai des informations pour l'interprétation des résultats de listes de gènes différentiels.

2.1.2.1 Identification de gènes différemment exprimés

Le choix de l'analyse statistique pour identifier les gènes différentiels repose en partie sur le nombre d'observation afin d'accepter ou non les hypothèses du modèle. Ainsi pour les données de microarray pour lesquelles une quarantaine d'observations étaient disponibles, j'ai utilisé l'analyse de variance (*ANalyis Of Variance,* ANOVA), alors que pour les données de qPCR avec seulement une dizaine d'observations, j'ai privilégié un test non paramétrique.

2.1.2.1.1 Analyse de variance avec des modèles linéaires

L'ANOVA permet d'étudier le comportement d'une variable à expliquer continue en fonction d'une ou plusieurs variables explicatives.

Par exemple dans l'analyse des cellules dendritiques, j'ai appliqué le modèle suivant à chaque gène :

$$y_{ijkl} = \mu + A_j + B_k + C_l + \varepsilon_{ijkl}$$

où y_{ijkl} représente la $i^{ème}$ expression d'un gène dans la lignée j, au temps k, avec le marquage de l'échantillon l ;
A_j est l'effet de la lignée à 2 modalités : A_1 pour résistant et A_2 pour sensible ;
B_k est l'effet du temps de stimulation à 3 modalités : B_1 pour T0, B_2 pour T3 et B_3 pour T8 ;
C_l est l'effet du marquage de l'échantillon à 2 modalités : C_1 pour Cy3 et C_2 pour Cy5 ;
ε_{ijk} représente le résidu du modèle distribué selon une loi normale centrée de variance σ^2.

L'ANOVA repose sur des hypothèses qu'il est nécessaire de vérifier : normalité des résidus, homoscédasticité des variances et indépendance des échantillons. Un microarray comporte des milliers de spots, et pour chaque spot, une analyse de variance est réalisée. Il est donc difficile de vérifier les postulats pour chaque analyse. On considère généralement que l'utilisation d'un nombre suffisant d'observations par spot (généralement n = 30) permet d'accepter les hypothèses. La normalité est vérifiée globalement, sur l'ensemble des spots de la puce, après transformation logarithmique (ici de base 2) des intensités brutes.

Le test de Fisher de chaque effet du modèle permet d'obtenir un niveau de signification de cet effet pour le spot étudié, en fonction du risque de première espèce α.

2.1.2.1.2 Correction sur les tests multiples

Dans les analyses de microarray, puisque une ANOVA est appliquée à chaque gène, soit plus de 10 000 analyses, le risque de déclarer une sonde différentielle alors qu'elle ne l'est pas peut s'avérer grand dans la liste finale. Il convient alors de corriger le seuil de signification pour la multiplicité des tests effectués. Il existe plusieurs méthodes, la plus

stricte, celle de Bonferroni, recalcule le risque de première espèce α en divisant α par le nombre de tests. Cette correction diminue fortement le taux de faux positifs, mais augmente le taux de faux négatifs. Généralement dans les analyses de microarray des corrections plus souples sont appliquées, la plus courante est celle de Benjamini Hochberg (Pawitan et al. 2005). Elle est basée sur les étapes suivantes (Benjamini et Hochberg 1995) : i) classement des p-values de la plus faible à la plus élevée (soit k l'ordre des tests), ii) maintien de la plus forte p-value telle quelle, et chaque p-value est multipliée par le nombre total de tests (n) divisé par son rang (k). Si cette p-value corrigée (ici, appelée q) est inférieure au risque de première espèce fixé, alors ce test est significatif.

$$q = p \times (n/k)$$

$$si\ q < \alpha \Rightarrow test\ significatif$$

$$si\ q > \alpha \Rightarrow test\ non\ significatif$$

2.1.2.1.3 Mesure des différences d'expression entre les conditions biologiques

L'analyse de variance permet d'obtenir les moyennes prédites de l'intensité d'expression d'un spot pour les différentes conditions biologiques testées, corrigées pour les autres effets du modèle. Elle permet également d'obtenir un test (test de Fisher) sur l'ensemble des contrastes pour les effets.

Lorsque les données ont été transformées par la fonction logarithmique de base 2 avant les analyses de variance, l'estimation de la moyenne correspond au logarithme du fold-change (FC). Le FC est souvent utilisé, en complément de la p-value (ou p-value corrigée par les tests multiples) pour identifier les sondes différentielles. Le seuil de FC utilisé est très variable dans les analyses de transcriptome, parfois aucune contrainte n'est appliqué sur le FC, parfois un seuil de 1,2, parfois de 1,5, 2, 5 ou 10. Biologiquement une différence de 20 ou 50% d'expression entre deux conditions (ce qui correspond à un FC de 1,2 ou 1,5) peut avoir des conséquences non négligeables sur les voies métaboliques. Il peut s'agir également d'un moyen pragmatique de réduire une grande liste de gènes différentiels aux différences les plus marquées.

2.1.2.1.4 Cas particulier des données de RT-qPCR

Pour les données de RT-qPCR, je disposais de 8 à 60 observations (12 en moyenne). Les hypothèses de normalité et d'homoscédasticité des variances requises pour l'ANOVA étaient souvent non respectées. Il était donc préférable d'utiliser un test non paramétrique qui ne fait pas d'hypothèse sur la distribution des échantillons, comme par exemple le test de Wilcoxon, aussi appelé test de Mann-Whitney.

Ce test repose sur la stratégie suivante : i) on rassemble les deux séries d'échantillons et on range toutes les valeurs par ordre croissant ; ii) on calcule la somme des rangs des Xi et des Yi (statistiques de Wilcoxon). La statistique du test de Wilcoxon est tabulée en fonction du nombre d'échantillons et donc du nombre de permutations possibles ; iii) on peut ainsi dire si les deux distributions sont égales (acceptation de l'hypothèse nulle) ou différentes (rejet de l'hypothèse nulle). La procédure ***npar1way*** de SAS permet de calculer le test de Wilcoxon.

2.1.2.2 Interprétation des listes de gènes

La partie précédente a permis d'identifier une liste de gènes différentiels. Lorsque la liste comporte peu de gènes, il est possible de consulter la littérature pour rechercher des informations sur chacun des gènes et sur leurs interactions. Cependant lorsque le nombre de gènes différentiels est grand, il est alors difficile de considérer individuellement chaque gène, et l'interprétation globale de la liste de gènes est recommandée. Il existe différentes bases de données qui recueillent soit des informations bibliographiques, soit des informations de séquences ou de fonctions des gènes connus et qui permettent d'établir des relations entre les différents gènes différentiels.

2.1.2.2.1 Les annotations de la puce ovine Agilent

Avant d'interpréter une liste de gènes, il est important de disposer d'une bonne annotation de celle-ci. La puce ovine Agilent (019921) possède 15208 sondes. Chaque sonde est désignée par un nom spécifique à Agilent. D'autres annotations sont disponibles par le constructeur de la puce : 93% des sondes ont un « TargetID » qui permet d'identifier les sondes dans certaines bases de données (NCBI notamment) et seulement 10 % des sondes ont une annotation HUGO qui est une nomenclature standardisée des gènes humains et qui est très utile pour interpréter les gènes.

L'équipe de SIGENAE a développé un outil sigReannot (Casel et al. 2009) qui permet d'annoter les séquences des sondes des microarrays pour vérifier et améliorer les annotations. Les annotations de la puce ovine Agilent sont disponibles sur le site de Sigenae (http://www.sigenae.org/ data : oligoset annotation / download annotation file : Agilent / Sheep 15K). La version 6 (juin 2010) que j'ai utilisée comportait 7 529 gènes ; la version actuelle (version 8, mars 2011) en contient 8 547. L'annotation globale de la puce est alors passée de 49,5 % à 56,2%.

Ainsi, pour chaque liste de gènes différentiels, une partie était annotée avec les données d'Agilent, une autre avec Sigenae, mais il manquait des annotations. Pour compléter la liste, j'ai utilisé la fonction BLAST de NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome, rubrique « nucleotid blast »). Je me suis référée à la base de données « Others », qui ne correspond ni à l'homme, ni à la souris et j'ai utilisé le programme de sélection qui optimisait la similarité des séquences (« blastn »). Ainsi à partir de l'annotation « Accession Number », j'ai pu obtenir le « Gene Symbol » qui correspond au nom HUGO. Grâce aux différentes approches d'annotation, seul un faible pourcentage (entre 1 et 5%) des sondes différentielles est resté non annoté.

2.1.2.2.2 Analyses de groupes de gènes

Pour analyser conjointement l'ensemble des gènes, il existe des méthodes qui permettent de regrouper ces gènes, selon leur niveau d'expression (clusters), selon leurs interactions les uns aux autres (réseaux de gènes), selon leurs grandes fonctions biologiques (analyses de Gene Ontology, GO), selon les voies dans lesquels ils sont impliqués, selon les facteurs de transcription qui peuvent les réguler. Je vais aborder ces différents points dans les paragraphes suivants.

Clusters de gènes

Une première approche pour donner du sens aux analyses transcriptomiques est de regrouper les gènes en fonction de l'évolution de leur niveau d'expression entre différentes conditions. Pour cela, on peut faire une classification hiérarchique des gènes qui permet de regrouper dans un cluster des gènes dont le niveau d'expression dans différentes conditions est corrélé. Plusieurs logiciels (R, package LIMMA, GeneSpring®) permettent de tracer ces graphiques, appelés ***heatmap***. Ils représentent dans les couleurs chaudes des gènes surexprimés et dans les couleurs froides des gènes sous-exprimés (Figure 9). Dans un heatmap chaque ligne correspond à un gène différentiel et chaque colonne correspond soit à un échantillon (Figure 9A), soit à une moyenne de tous les échantillons dans une condition (Figure 9B). L'arbre des corrélations entre les différents groupes de gènes (à gauche des graphiques) permet de déterminer des sous-groupes de gènes (*clusters*) qui ont des niveaux d'expression fortement corrélés.

L'élaboration de clusters ne permet pas de donner du sens biologique à une liste de gènes, mais elle permet de regrouper des gènes qui sont surexprimés ou inhibés dans certaines conditions pour interpréter plus finement les listes de gènes.

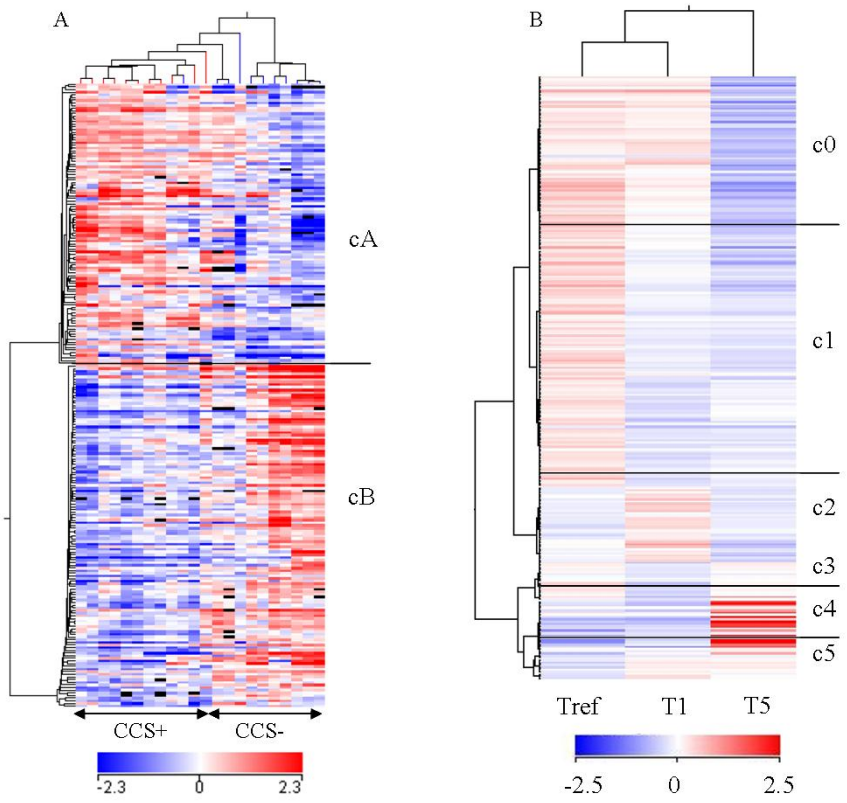


Figure 9 : Classification hiérarchique des gènes avec un heatmap. Chaque ligne correspond à un gène, chaque colonne correspond à un échantillon (figure A) ou à la moyenne de tous les échantillons à un temps donné au temps de référence (Tref), après 1 ou 5 h de stimulation (T1 et T5, respectivement) pour ce gène donné (figure B). Les arbres sur la gauche des graphiques permettent de déterminer des sous-groupes (*clusters*) de gènes qui ont des variations d'expression fortement corrélées.

Analyses des fonctions et des voies biologiques

Une autre approche pour donner du sens biologique à la liste de gènes différentiels consiste à rassembler les gènes autour de grandes fonctions biologiques déjà connues. Il existe

plusieurs bases de données dans lesquelles de nombreux gènes sont renseignés et rattachés à une ou plusieurs voies métaboliques.

Par exemple dans la base de données Gene Ontology (GO, http://www.geneontology.org/), les gènes sont classés dans différentes identités des trois grandes ontologies : i) les compartiments cellulaires (*cellular component, CC*), ii) les fonctions moléculaires (*molecular function, MF*), et iii) les processus biologiques (*biological processus, BP*).

La base de données KEGG (KEGG, http://www.genome.jp/kegg/) est composée de seize bases de données principales, rangées dans différentes catégories : information systémique, information chimique et information génomique qui sont largement utilisées comme référence pour l'interprétation biologique de jeux de données générés par les analyses à haut-débit.

La base de données Ingenuity Pathway Knowledge Base (IPKB, http://www.ingenuity.com/products/pathways_knowledge.html) dérive des fonctions et interactions de gènes entre eux qui sont publiées dans la littérature. A chaque gène est attribué une fonction (par exemple « croissance cellulaire et prolifération ») et une sous-fonction (comme « formation de colonie »).

Dans chacune des bases de données Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, http://www.genome.jp/kegg/) et Ingenuity Pathway Knowledge Base (IPKB, http://www.ingenuity.com/products/pathways_knowledge.html), respectivement des « KEGG pathways » ou des "canonical pathways" sont prédéfinis.

Des logiciels tels que DAVID (Database for Annotation, Vizualization and Integrated Discovery, version 6.7, http://david.abcc.ncifcrf.gov/), IPA (Ingenuity Pathway Analysis, http://www.innatedb.com/), ou InnateDB (Innate Data Base, http://www.innatedb.com/) permettent de consulter ces bases et d'établir une valeur statistique pour savoir si une fonction biologique ou une voie métabolique est assignée à cette liste de gènes différentiels par hasard ou pas.

Analyses de réseaux de gènes

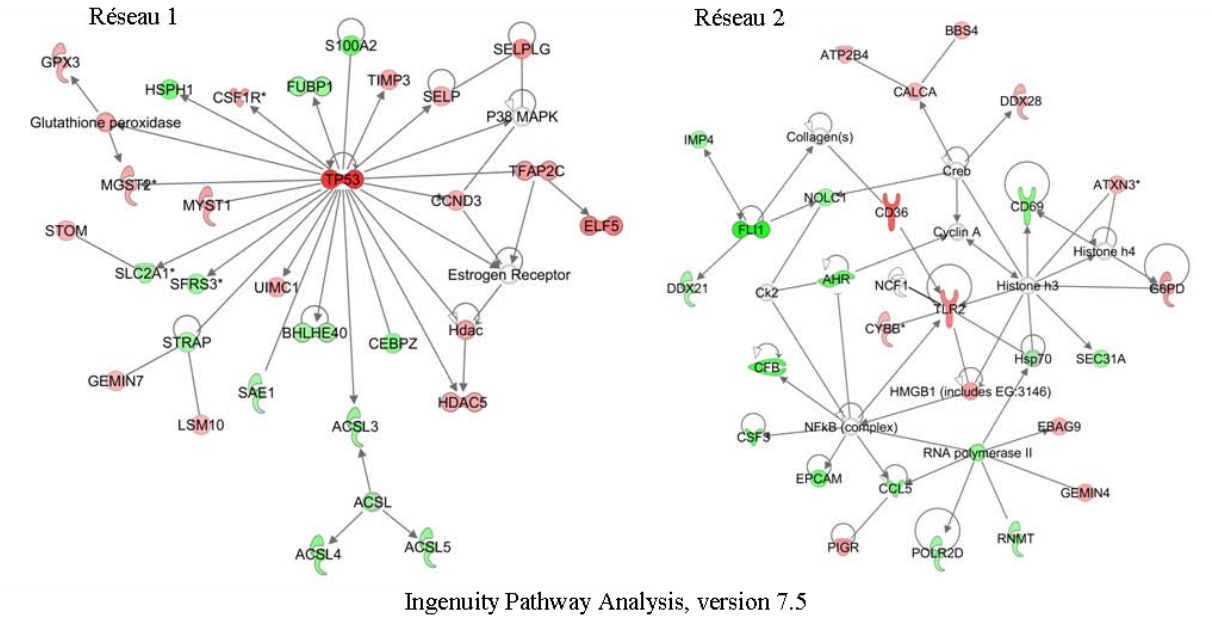
Une analyse complémentaire consiste à étudier les différents liens qui existent entre les gènes différentiels deux à deux. Ces liens peuvent être de différente nature : régulation, répression, phosphorylation, oxydation … Dans les analyses de réseau, comme le proposent IPA et InnateDB, ces informations sont répertoriées et représentées sous forme de réseau de gènes. Dans un réseau, les gènes correspondent à des points et les arêtes à des relations biologiques qui ont été publiées auparavant. D'autres gènes, qui interagissent avec un ou plusieurs gènes de la liste étudiée peuvent être ajoutés aux réseaux pour compléter l'information.

Selon le logiciel utilisé les annotations de gène à fournir sont différentes. Le logiciel IPA accepte vingt-cinq annotations différentes, dont Ensembl, EntrezGene, GenBank, HUGO Gene Symbol, RefSeq, … tandis que le logiciel InnateDB n'en accepte que cinq : InnateDB, Ensembl, EntrezGene, RefSeq et Uniprot. Il est possible de convertir les HUGO Gene Symbol en annotation Ensembl, à partir d'un site accessible en ligne (http://www.ensembl.org/index.html), par l'intermédiaire du « Biomart » et de la base de données Ensembl Genes 62. Pour les analyses de réseau, IPA et InnateDB utilisent les p-values des tests de significativité et/ou les FC pour chaque gène. Ensuite, les logiciels

établissent un ou plusieurs réseaux en incorporant des gènes reliés par une ou plusieurs arêtes et calculent des scores ou des p-values pour ces réseaux selon leur vraisemblance.

Dans IPA, l'utilisateur choisit le nombre maximum de molécules à incorporer dans un réseau et le nombre maximum de réseaux générés. Puis le logiciel calcule un score en fonction du nombre de gènes dans le réseau et du nombre de gènes dans la liste en prenant en compte la p-value de chaque gène et son FC. Plus le score d'un réseau est grand, plus ce réseau apporte de l'information et plus il est fiable. Les scores peuvent atteindre 50 unités, et en général on considère qu'un réseau est informatif si son score est supérieur à 20. De plus chaque réseau est qualifié par trois grandes fonctions qui caractérisent certains gènes du réseau. Il existe différents types de réseaux. Par exemple dans le réseau 1 (Figure 10), TP53 représente un noyau, *ie* c'est un gène qui structure fortement ce réseau, car de nombreux gènes gravitent autour de lui et si on l'enlève la structure du réseau est complètement bouleversée. Ainsi, ce gène a une influence forte sur le phénomène étudié. Une légère surexpression ou inhibition de ce gène va se répercuter sur l'expression de nombreux gènes. En revanche, dans le réseau 2 (Figure 10), on ne retrouve pas cette notion de noyau. Mais on voit globalement plusieurs gènes dont l'expression varie selon les conditions et qui ont des interactions entre eux.

InnateDB permet de faire des analyses de réseaux comme IPA, mais il se concentre principalement sur l'étude des gènes de l'immunité innée.



Ingenuity Pathway Analysis, version 7.5

Figure 10 : Exemples de deux réseaux de gènes obtenus avec IPA. Les gènes dont l'expression est augmentée sont en rouge et les gènes dont l'expression est inhibée sont en vert.

Analyse des facteurs de transcription

Plusieurs gènes, présents dans une liste de gènes différentiels, possèdent parfois un même fragment de séquence, notamment dans la région promotrice sur laquelle peut se fixer des facteurs de transcription. Ces séquences correspondent aux sites de liaison à un facteur de transcription (« Transcription Factor Binding Site », TFBS). Si un TFBS est présent plusieurs fois dans une liste de gènes différentiels, il est possible que ces gènes soient sous la régulation de ce même facteur de transcription. Ainsi la recherche de facteurs de transcription qui

régulent plusieurs gènes différentiels est intéressante dans la perspective de recherche d'une mutation causale.

Le logiciel InnateDB permet d'identifier des facteurs de transcription qui régulent des gènes présents dans une liste d'intérêt.

2.1.2.3 Analyse d'enrichissement

En parallèle de la recherche de gènes différentiels et de l'interprétation de la liste de gènes considérée, il est possible de faire des analyses d'enrichissement pour savoir si une fonction biologique est activement représentée dans un jeu de données. Avec cette approche, on s'intéresse plus aux fonctions des gènes qu'aux gènes eux-mêmes. La méthode de calcul GSEA (Gene Set Enrichment Analysis, http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp) permet de déterminer si dans une liste de gènes, un groupe de gènes (*gene set*) défini *a priori* a des valeurs différentes entre deux conditions. Les principales étapes de l'analyse GSEA sont les suivantes : i) calcul de la statistique t du test de student ou du FC entre deux conditions étudiées, ii) tri des gènes selon cette valeur, iii) analyse d'enrichissement en se demandant si les gènes d'une liste d'intérêt qui appartiennent aussi à *gene set* sont distribués aléatoirement. Dans la base de données GSEA, il existe déjà cinq collections de *gene sets*, qui se basent sur la localisation des gènes (C1), sur des voies métaboliques établies (C2), sur des motifs de séquences régulatrices (C3), sur des calculs (C4, basé sur des analyses de cancer) et sur les annotations GO (C5). Il est possible de définir soi-même de nouveaux jeux de gènes ; iv) calcul de la p-value ou du score du test d'enrichissement v) permutations des données et calcul des p-values ou scores, vi) comparaison des p-values obtenues avec le jeu de données et de celles obtenues après permutation et estimation de l'enrichissement pour un set de gènes.

L'analyse GSEA est principalement utilisée, lorsque très peu, voire pas du tout de gènes ont été identifiés par analyse de gènes différentiels, ou en complément de l'analyse de gènes différentiels.

2.1.3 Comment confirmer les résultats ?

Les analyses de microarray permettent d'identifier des gènes différemment exprimés entre plusieurs conditions. Bien que la préparation des échantillons, leur hybridation et l'analyse statistique des résultats soient très rigoureuses, il est généralement recommandé de valider les gènes différentiels au moins en partie par une approche différente.

Classiquement, l'expression de quelques gènes différentiels est mesurée par RT-qPCR quantitative à partir d'amorces spécifiques de ces transcrits. Ces gènes sont choisis soit car ils ont un FC élevé soit pour leurs propriétés biologiques. Si possible, les RT-qPCR sont réalisées sur des échantillons indépendants de ceux testés en microarray. Mais lorsque l'obtention de réplicats biologiques est difficile les confirmations sont établies sur les mêmes échantillons.

D'autres approches pour valider un gène différentiel sont également possibles. Par exemple, l'expression de la protéine associée à l'ARNm peut être mesurée, mais il a été montré qu'une augmentation de l'ARNm n'augmentait pas toujours celle de la protéine associée en relation avec toutes les étapes de maturation des ARNm et du décalage dans le temps. L'implication de ce gène dans une voie métabolique peut aussi être mise en évidence par inhibition ou activation de l'expression de ce gène dans un modèle cellulaire ou chez la

souris. Les études de souris *knock out* peuvent permettre de démontrer le rôle d'un gène dans un processus métabolique.

La comparaison du transcriptome des brebis de la lignée CCS+ et de celles de la lignée CCS- peut permettre d'identifier des mécanismes qui sont différemment régulés au sein de chaque lignée. Ils peuvent aussi permettre de formuler de nouvelles hypothèses sur des gènes fonctionnels candidats dont l'expression peut être associée à des formes de résistance ou de sensibilité aux IMI.

2.2 Etude du polymorphisme de l'ADN

L'étude du polymorphisme de l'ADN entre les deux lignées de brebis peut permettre à la fois de confirmer des hypothèses qui ont été formulées à partir des analyses du transcriptome et d'identifier de nouvelles régions chromosomiques associées aux CCS, voire d'émettre de nouvelles hypothèses de mutations/gènes candidats responsables des différences de sensibilité aux mammites.

2.2.1 Un outil de choix pour l'étude du polymorphisme chez l'ovin : la puce SNP 54K d'Illumina

Grâce aux avancées technologiques récentes en génétique moléculaire, il existe depuis 2009 un outil à haut débit de choix pour étudier le polymorphisme de l'ADN chez le mouton : la puce SNP ovine (BeadChip ovine 54K) développée par Illumina en collaboration avec le consortium International ovin (International Sheep Genomics Consortium, ISGC http://www.sheephapmap.org/). Elle contient 54 241 SNP, qui ont été détectés grâce au séquençage de 60 animaux de quinze races ovines différentes. Ces SNP ont été choisis pour être polymorphes dans la plupart des races ovines. Ils ont aussi été définis de façon à ce qu'ils soient répartis uniformément sur l'ensemble du génome ovin. L'espacement entre deux SNP est de 50.9 kbases en moyenne (42.5 kbases en médiane). Ils ont aussi été définis de façon à ce que le risque de se tromper lors de l'attribution d'un génotype à un animal soit le plus faible possible, ce qui correspond à un ***call rate*** supérieur à 99% pour chaque SNP de la puce lors des tests réalisés avant la commercialisation de la puce SNP ovine.

La technologie de la puce, Infinium HD assay, repose sur une amplification du génome complet sans PCR, puis une fragmentation des molécules d'ADN et une détection des allèles en deux étapes : tout d'abord une hybridation des fragments d'ADN non marqués sur les oligonucléotides de 50 mères (sélectivité), puis l'extension d'une seule base par une enzyme avec un nucléotide marqué (spécificité).

La puce SNP ovine contient douze arrays identiques ; douze échantillons peuvent ainsi être hybridés et analysés en parallèle.

2.2.2 Les méthodes d'étude du polymorphisme de l'ADN

Il existe deux approches pour découvrir des polymorphismes de l'ADN intéressants. i) L'approche **gène candidat** qui a déjà permis d'identifier et de caractériser l'effet de variants génétiques (Andersson et Georges 2004), comme pour le gène spécifiant la caséine alpha s1 chez les caprins (composition protéique du lait) (Grosclaude et al. 1972) ou pour le gène codant pour la protéine prion chez les ruminants (résistance à la tremblante) (Hunter

1997). Mais cette approche ne permet pas d'identifier toutes les mutations (par exemple dans les zones inter-géniques) et est souvent limitée au niveau de connaissance *a priori* de la fonction biologique étudiée. ii) La **détection de QTL** nécessite des marqueurs du polymorphisme de l'ADN répartis sur tout le génome et suffisamment nombreux pour étudier, sans *a priori*, l'association entre les variations alléliques de l'ADN et les variations du caractère quantitatif. Actuellement, les études utilisent généralement les SNP comme marqueurs.

Il existe trois grandes classes de méthodes pour la détection de QTL au sens large : les analyses de liaison (*Linkage Analysis*, LA), les analyses d'association (*Linkage desequilibrium*, LD) et des méthodes qui combinent les deux méthodes précédentes (LDLA). Ces trois méthodes et leurs applications sont présentées brièvement dans les paragraphes suivants.

Les analyses de liaison

L'**analyse de liaison** (LA) se base sur la **transmission des allèles au sein d'une famille** et donc sur la notion d'apparentement entre animaux. Si on considère un père hétérozygote à un marqueur, et avec un grand nombre de descendants, on peut séparer ses descendants en deux groupes : ceux qui ont reçu l'allèle A_1 du père et ceux qui ont reçu l'allèle A_2 du père. On mesure le phénotype des animaux de chaque groupe et s'il existe une différence significative entre les phénotypes des deux groupes, on considère qu'il existe un QTL lié au marqueur pour ce caractère.

Pour utiliser cette méthode, il est important d'avoir des dispositifs d'animaux structurés de grande taille qui maximisent la probabilité que les QTL ségrégent. Il existe des **dispositifs de familles de pères** (protocole filles ou petites-filles) qui utilisent les déséquilibres de liaison intra-famille (avec respectivement deux ou trois générations) ou en croisement (back cross, F1) avec mise à la reproduction de deux populations génétiquement éloignées de façon à générer un déséquilibre de liaison aussi important que possible dans la population des descendants. Cependant pour améliorer la précision de la localisation des QTL, il faut augmenter le nombre d'événements de recombinaison survenus dans la population étudiée. Deux stratégies peuvent être établies, i) ajouter des animaux, en pratique, un grand nombre d'animaux pour avoir une recombinaison dans la zone étudiée, ii) intensifier la densité des marqueurs. Mais ces deux stratégies sont souvent très coûteuses et longues à mettre en place.

Les analyses de liaison ont été largement utilisées dans toutes les espèces de rente pour un grand nombre de caractères, et pour la résistance aux mammites chez les ruminants laitiers en particulier (Rupp et Boichard 2003; Khatkar et al. 2004; Smaragdov 2006; Ogorevc et al. 2009; Rupp et Foucras 2010). Bien qu'un grand nombre de QTL ait été détecté pour la résistance aux mammites (80 chez les bovins et 9 chez les ovins) (Rupp et Foucras 2010), la localisation précise de ces QTL n'est pas très bonne. Les intervalles de confiance sont encore grands et renferment de nombreux gènes, ce qui rend difficile la recherche de mutations causales. Jusqu'à présent, un seul QTL associé à la résistance aux mammites a été caractérisé finement (Sugimoto et al. 2006).

Les analyses d'association

Lorsqu'un grand nombre de marqueurs est disponible (des dizaines de milliers, comme dans les analyses de SNP), une alternative aux analyses de liaison est possible. Il s'agit

d'exploiter le **déséquilibre de liaison** (*Linkage desequilibrium*, LD) pour détecter des QTL **dans la population entière** et non plus au sein des familles.

Le déséquilibre de liaison correspond à une **association non aléatoire d'allèles entre deux loci**. Si on considère deux marqueurs A et B, situés sur le même chromosome. Il existe alors quatre haplotypes A_1B_1, A_1B_2, A_2B_1 et A_2B_2. Si les fréquences des allèles A_1, A_2, B_1 et B_2 dans la population sont toutes de 0,5, alors les fréquences attendues de chacun des quatre haplotypes sont de 0,25. Toute déviation des fréquences haplotypiques de 0,25 est considérée comme un déséquilibre de liaison, c'est-à-dire que les gènes ne sont pas associés aléatoirement.

En génétique animale, les animaux sont souvent apparentés (frères-sœurs, demi-frères-soeurs). Il faut donc prendre en compte les facteurs qui influencent la stratification de la population (sélection, goulot d'étranglement, structure familiale, pedigree, effets du milieu). Ces facteurs créent une différence de fréquence allélique entre les sous-groupes de la population, ce qui entraîne l'apparition de faux positifs ou faux négatifs (Cardon et Palmer 2003, Clayton et al 2005 et Marchini et al (2004). Certains modèles des études de déséquilibre de liaison permettent de prendre en compte les liens de parenté entre les animaux.

Les analyses combinées

Traditionnellement, les études familiales (avec des pères et leurs descendants) se basent sur des études de liaison (LA) et les études de population sur des analyses d'association (LD). Mais avec l'apparition des **puces SNP à haute densité**, les intervalles entre deux marqueurs ont été fortement réduits et les études familiales peuvent être analysées par des **études de liaison** (**LA**) qui assurent une **robustesse** en regard de la structure de la population, tout en intégrant le **déséquilibre de liaison** (**LD**) pour conserver la **puissance** de l'analyse. Il s'agit des analyses **LDLA**. Ainsi, il est possible de tester s'il existe une association entre un marqueur et un QTL en prenant en compte la transmission d'allèles des parents aux descendants et en utilisant l'information du déséquilibre de liaison dans la population observée.

Les analyses présentées auparavant peuvent s'appliquer SNP par SNP et tester l'association entre un seul marqueur et un phénotype, mais il est possible de faire des tests d'association entre plusieurs marqueurs et un phénotype (analyses multi SNP) qui peuvent soit prendre en compte l'haplotype, soit ne pas le prendre en compte.

2.2.3 Vers l'identification des gènes et mutations causales

Les méthodes précédentes permettent d'identifier plusieurs SNP qui représentent un QTL dont la fréquence génotypique est associée au phénotype étudié. Pour autant, les SNP ne représentent pas la **mutation** responsable de ce QTL, mais on fait l'hypothèse que celle-ci se situe à proximité dans un intervalle de confiance. Plusieurs stratégies peuvent être déployées pour arriver à l'identification des mutations causales.

La première approche consiste à formuler des **hypothèses sur des gènes candidats** et à vérifier ces hypothèses. La région QTL identifiée précédemment est positionnée sur le génome ovin (version 2, http://www.livestockgenomics.csiro.au/cgi-bin/gbrowse/oarv2.0/). Comme on fait l'hypothèse que la mutation responsable de ce QTL est située à proximité, les gènes situés sur le génome ovin dans l'intervalle de confiance du QTL sont de bons candidats positionnels. Si un gène est un bon candidat positionnel, on peut le séquencer. Selon la longueur du gène, on peut soit le séquencer entièrement (petite taille), soit ne séquencer que

ses exons après rétro-transcription de son ARNm. Si le séquençage du gène permet d'identifier deux haplotypes qui sont associés à deux phénotypes différents, alors la mutation est identifiée et l'hypothèse de gène candidat est validée. Cependant, la mutation responsable du QTL peut être située dans une zone non codante, elle ne sera donc pas identifiée par cette méthode. De plus, les intervalles de confiance sont parfois trop larges (des dizaines de milliers de paires de bases, avec des dizaines voire des centaines de gènes) pour formuler une hypothèse sur un gène candidat. Il faut alors développer une autre approche.

La **cartographie fine** de la zone d'intérêt consiste à **ajouter de nouveaux marqueurs** génétiques dans cette zone pour affiner la localisation de la mutation. Différents marqueurs peuvent être ajoutés. En premier lieu si d'autres SNP ou microsatellites sont disponibles, ils sont incorporés. Puis il est possible de séquencer quelques animaux pour essayer d'identifier de nouveaux marqueurs (souvent des SNP) et de génotyper les animaux sur ces nouveaux marqueurs. Toutefois, ce travail d'ajout de marqueurs est souvent difficile et nécessite beaucoup de temps d'expérimentation.

Actuellement, les progrès technologiques permettent de **séquencer** la zone d'intérêt de tous les animaux disponibles, soit en séquençant tout le génome, ce qui demande beaucoup de travail de bioinformatique, soit en séquençant uniquement la zone ciblée, ce qui demande beaucoup de temps de préparation des échantillons et est aussi coûteux que le séquençage complet.

Ainsi, ces stratégies de séquençage de gènes candidats, de cartographie fine ou de séquençage complet de la zone d'intérêt permettent de réduire l'intervalle de confiance dans lequel se situe la mutation responsable du QTL. Parfois, selon les recombinaisons présentes chez les animaux étudiés, elles permettent d'identifier précisément cette mutation. Mais elles sont souvent très longues à mettre en place et extrêmement coûteuses. Lorsqu'une mutation intéressante est identifiée, ses allèles peuvent être considérés dans les programmes de sélection.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS PARTIELLES

PARTIE 1 : ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DES CELLULES SOMATIQUES DU LAIT CHEZ DES BREBIS DE LA LIGNEE RESISTANTE ET DE LA LIGNEE SENSIBLE AUX MAMMITES APRES INFECTION EXPERIMENTALE PAR *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* ET *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

1 Contexte et objectifs

Lors d'une infection de la glande mammaire, une forte augmentation du nombre de cellules somatiques dans le lait est observée (Paape et al. 2002; Kehrli et Shuster 1994). Ces cellules jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire protectrice de la glande mammaire à la suite d'une infection (Rinaldi et al. 2010). Cette augmentation est principalement due au fort recrutement de neutrophiles qui deviennent la population cellulaire dominante dans le lait d'une mamelle infectée (Lee et al. 1980; Sordillo et al. 1997). Les neutrophiles ont la capacité de phagocyter les bactéries et donc d'éliminer l'infection (Paape et al. 2003). Lorsque l'infection est maîtrisée, la concentration des cellules somatiques du lait diminue, mais elle reste élevée si l'infection persiste sous la forme chronique.

Les deux lignées divergentes de brebis, respectivement sensibles et résistantes aux mammites, ont été sélectionnées sur l'index SCS de leurs parents. Celui-ci est calculé à partir d'une information limitée à trois CCS annuels en moyenne après la phase d'allaitement et effectuées lors du contrôle laitier officiel. La sélection s'opère donc de façon indirecte sur le recrutement des cellules de l'immunité dans la glande mammaire et/ou sur l'efficacité de ce recrutement dans la lutte contre les infections. Ainsi, la première étape de notre travail a été d'étudier les cellules immunitaires qui sont mobilisées dans la glande mammaire lors d'une infection mammaire, et qui sont accessibles dans le lait.

Deux groupes de six brebis de la lignée résistante et six brebis de la lignée sensible ont été inoculées par voie diathélique, avec *Staphylococcus epidermidis* la première année, puis *Staphylococcus aureus* au cours de la lactation suivante, un an plus tard. Ces deux bactéries ont été choisies car elles appartiennent au genre *Staphylococcus* et qu'elles correspondent aux principaux agents responsables de mammites chez les ovins (Ariznabarreta et al. 2002). *S. epidermidis* est une bactérie coagulase négative qui est très fréquemment isolée chez les ovins (Gonzalez-Rodriguez et al. 1995) ; peu virulente, elle provoque surtout des mammites sub-cliniques. Au contraire, *S. aureus* est une bactérie qui exprime la coagulase et qui est un agent pathogène majeur chez tous les ruminants laitiers. *S. aureus* est principalement associé à des formes cliniques, mais aussi plus rarement des formes chroniques de mammites chez les petits ruminants (Sordillo 2005; Paape et al. 2002). L'étude de la réponse des brebis de la lignée résistante et de la lignée sensible, à ces deux pathogènes permet ainsi d'évaluer la réponse aux différents types d'infections mammaires vis-à-vis des bactéries les plus communément isolées, et représentatives de la plupart des agents responsables de mammites chez les ovins.

Les CCS ont été mesurés dans les 24h qui ont suivi l'inoculation. Aucune différence significative des CCS n'a été observée entre les deux groupes de brebis dans cet intervalle de temps. En revanche, le titre bactérien a diminué plus vite chez les brebis de la lignée résistante que chez les brebis de la lignée sensible. Ainsi, nous avons fait l'hypothèse que **les propriétés**

des neutrophiles du lait chez les brebis de la lignée résistante sont différentes de celles des neutrophiles des brebis de la lignée sensible en relation avec une meilleure capacité à éliminer les bactéries. Ces travaux rapportés dans ce premier article ont pour objectif d'évaluer cette hypothèse au niveau transcriptionnel.

2 Résumé

Des échantillons de cellules somatiques du lait ont été collectés 12h après chaque inoculation ; l'expression des gènes des CSL a été étudiée à l'aide de la technologie microarray. Dans un premier temps, la réponse de l'hôte a été analysée en fonction du pathogène inoculé. Nous avons montré qu'un très grand nombre de gènes (n=5573) a des niveaux d'expression différents selon que les cellules ont été obtenues après une infection par *S. aureus* ou par *S. epidermidis*. Ce constat révèle que l'activation de la réponse immunitaire est différente en réponse à ces deux pathogènes. De plus, les gènes codant pour la chimiokine CXCL10 (C-X-C motif ligand 10) et la protéine CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4) qui marque la présence de cellules T, sont fortement exprimés par les cellules de l'infection à *S. aureus*. D'autres gènes impliqués dans la migration des neutrophiles depuis le sang vers le foyer d'infection (responsables de l'adhésion des neutrophiles à la paroi des cellules endothéliales et de la diffusion de chimiokines qui jouent un rôle attracteur pour les neutrophiles), sont aussi surexprimés dans les CSL collectées au cours de cette infection. Trois sous-unités du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II sont également fortement exprimées lors de cette infection. De plus, il est probable que la cinétique de recrutement/mort des cellules est plus élevée pour les CSL de l'infection par *S. aureus,* car les phénomènes apoptotiques y sont plus marqués.

Puis, les répertoires des gènes exprimés par les hôtes résistants et sensibles ont été comparés. L'amplitude des différences est bien plus faible que celle obtenue précédemment en comparant les CSL de l'infection par *S. aureus* et celle par *S. epidermidis* (n=52 gènes différentiels). Mais les fonctions biologiques de ces gènes sont informatives car elles interviennent dans des voies associées à la réponse immunitaire. La voie du TLR2 est plus exprimée chez les brebis de la lignée résistante avec l'expression des gènes *tlr2* et *cd36* ; elle active la voie de signalisation MAPK/ERK. Même si les cytokines et chimiokines les plus connues (IL1β, TNFα, IL6, IL8) ne sont pas différemment exprimées entre les brebis de la lignée résistante et de la lignée sensible, d'autres molécules (ITGB6, SAA2 et S100A2) associées à l'inflammation sont plus fortement exprimées chez les brebis de la lignée résistante. En parallèle, la diapédèse, qui correspond au passage des neutrophiles du sang vers le foyer d'infection, est fortement modifiée entre les deux groupes de brebis. Les gènes codant pour les sélectines SELP, SELPG, l'intégrine ITGA5, CCL5 (aussi appelé RANTES), ALCAM (*activated leukocyte cell adhesion molecule*), ST3GAL4 et CAPN3 qui jouent un rôle dans le ralentissement des neutrophiles sur l'endothélium et dans leur adhésion à la paroi des cellules endothéliales sont plus exprimés chez les brebis de la lignée résistante.

En outre, trois facteurs de transcription RARα, TP53 et AHR sont associés aux différences entre les brebis de la lignée résistante et de la lignée sensible, les deux premiers gènes sont plus exprimés chez les brebis de la lignée résistante, tandis que AHR est moins-exprimé chez les brebis de cette lignée. De plus, l'implication de certains gènes surexprimés chez les brebis de la lignée résistante suggèrent fortement que l'apoptose et la prolifération cellulaire (*mapre1, znf259, gzmh cryl1* et *tp53*), ainsi que la granulopoièse (*cebpa* et *rara*) sont favorisées chez les brebis de la lignée résistante.

3 Article 1

Références :

Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus.

Bonnefont CMD, Toufeer M, Caubet C, Foulon E, Tasca C, Aurel MR, Bergonier D, Boullier S, Robert-Granié C, Foucras G, Rupp R.

BMC Genomics. 2011 Apr 28;12:208.

DOI : 10.1186/1471-2164-12-208

URL : http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/208

Bonnefont et al. BMC Genomics 2011, 12:208
http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/208

BMC Genomics

RESEARCH ARTICLE Open Access

Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*

Cécile MD Bonnefont[1,2,3], Mehdi Toufeer[2,3], Cécile Caubet[2,3], Eliane Foulon[2,3], Christian Tasca[2,3], Marie-Rose Aurel[4], Dominique Bergonier[2,3], Séverine Boullier[2,3], Christèle Robert-Granié[1], Gilles Foucras[2,3*†] and Rachel Rupp[1†]

Abstract

Background: The existence of a genetic basis for host responses to bacterial intramammary infections has been widely documented, but the underlying mechanisms and the genes are still largely unknown. Previously, two divergent lines of sheep selected for high/low milk somatic cell scores have been shown to be respectively susceptible and resistant to intramammary infections by *Staphylococcus spp*. Transcriptional profiling with an 15K ovine-specific microarray of the milk somatic cells of susceptible and resistant sheep infected successively by *S. epidermidis* and *S. aureus* was performed in order to enhance our understanding of the molecular and cellular events associated with mastitis resistance.

Results: The bacteriological titre was lower in the resistant than in the susceptible animals in the 48 hours following inoculation, although milk somatic cell concentration was similar. Gene expression was analysed in milk somatic cells, mainly represented by neutrophils, collected 12 hours post-challenge. A high number of differentially expressed genes between the two challenges indicated that more T cells are recruited upon inoculation by *S. aureus* than *S. epidermidis*. A total of 52 genes were significantly differentially expressed between the resistant and susceptible animals. Further Gene Ontology analysis indicated that differentially expressed genes were associated with immune and inflammatory responses, leukocyte adhesion, cell migration, and signal transduction. Close biological relationships could be established between most genes using gene network analysis. Furthermore, gene expression suggests that the cell turn-over, as a consequence of apoptosis/granulopoiesis, may be enhanced in the resistant line when compared to the susceptible line.

Conclusions: Gene profiling in resistant and susceptible lines has provided good candidates for mapping the biological pathways and genes underlying genetically determined resistance and susceptibility towards *Staphylococcus* infections, and opens new fields for further investigation.

Background

Mastitis is defined as an inflammation of the udder, mainly caused by an infection by various bacterial species. Amongst infectious diseases, intramammary infections (IMI) are of major importance in dairy ruminants because of their high frequency and the increased production costs that they incur (loss of milk, treatment, culling). The most prevalent etiological group causing mastitis in sheep is *Staphylococcus* with 78.9% of positive cultures [1]. Coagulase-Negative *Staphylococci* (CNS) are particularly frequent and represent 74.8% of all isolates, most of which are *S. epidermidis* (*Se*) [2]. CNS are considered to be minor pathogens, causing moderate inflammatory responses and often subclinical infections in dairy ruminants [1]. On the contrary, Coagulase-Positive *Staphylococci* (CPS), largely represented by *S. aureus* (*Sa*), are major pathogens in all dairy species. They are principally associated with both chronic

* Correspondence: g.foucras@envt.fr
† Contributed equally
[2]INRA, UMR1225, IHAP, F-31076 Toulouse, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2011 Bonnefont et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

and clinical forms of mastitis [3,4], some of which can be very severe and in the worst case lead to a high mortality rate.

Although much work has been carried out in dairy ruminants to understand the complex physiological and cellular events that occur in the mammary gland in response to pathogens [3-5], the protective mechanisms are still obscure. Schematically, when pathogens enter the udder lumen via the teat canal, they are detected by both immune and non-immune cells, and this is followed by the release of chemoattractants. As a consequence, neutrophils migrate from the blood flow to the infection site [4]. These cells can phagocyte bacteria and exert bactericidal activities by releasing potent oxidative products [6]. This massive recruitment of neutrophils in the udder incurs a dramatic increase in the milk somatic cell count (SCC) [5]. Accordingly, SCC has been widely advocated as an easy-to-measure tool for predicting mastitis and discriminating between chronically infected and non-infected animals [5,7]. Recent advances in microarray technology, that nowadays enable the expression analysis of thousands of infection-related genes, have provided novel insights into host response to pathogens. Microarray analysis is a well-adapted technology to investigate the gene regulation mechanisms underlying immunity against pathogens. Previously, gene expression profiles for challenged mammary tissue [8-11], milk cells [12] and peripheral blood mononuclear cells [13] have been studied using microarrays.

There is overwhelming evidence that the host's response to IMI is under genetic control, as extensively described in earlier studies [14-18]. Genetic parameters have been established for milk somatic cell scores (SCS) and occurrence of clinical mastitis, thus indicating that five to twenty percent of all variability between individuals is of genetic origin. Additionally, numerous quantitative trait loci (QTL) for udder health traits have been identified [16,19]. However, up to date, only one of these QTL - the forebrain embryonic zinc finger-like gene -has been fully characterised [20]. Apart from this QTL, the genetic basis of resistance is still largely unknown.

Nevertheless, breeding programmes for mastitis resistance have been implemented throughout the world in dairy cattle [14,16] and sheep [21] using indirect predictor traits such as clinical mastitis and SCS. To assess the effect of SCS-based selection for resistance or susceptibility to IMI, two divergent lines of dairy sheep were created on the basis of their parents' breeding values for SCS [22]. Evaluation of the frequency and duration of mastitis in the two lines demonstrated that selection for decreased SCS is associated with a decrease of IMI [22].

In the present study, we performed transcriptomic analysis of milk somatic cells (MSC), collected from mastitis resistant and susceptible ewes using a generic 15K oligonucleotide chip. MSC were collected after challenge with *Se* and *Sa* during the first and second lactations respectively. Our objective was to use this animal-model of divergent-SCS-lines in order to identify some of the genes and molecular mechanisms involved in the genetic basis of the protective host response to staphylococcal IMI.

Results

Experimental challenges

Clinical examination of the mammary gland, bacteriological analyses and SCC confirmed that all animals were free from udder infections before challenges.

At the beginning of the first infection with *Se*, the SCS increased rapidly in the inoculated half udder (Figure 1A). It then increased at a slower rate after the second infection with *Sa* in the contra-lateral half udder (Figure 1B). Consequently, the SCS were higher upon *Se* than upon S*a* challenge at 12 hours (μ_{Se} = 10.1 ± 0.7, μ_{Sa} = 6.6 ± 1.0, $p < 0.001$), although the contrary was observed at 24 hours (μ_{Se} = 9.3 ± 3.7, μ_{Sa} = 10.8 ± 0.19, $p = 0.18$). Bacteriological titres (Figure 1C and 1D) were significantly higher after *Sa* challenge than after *Se* challenge over the period from 24 to 48 hours (μ_{sa} = 12.9 ± 2.0, μ_{se} = 4.1 ± 4.1, $p < 0.001$).

No significant differences were observed for milk SCS between the resistant and susceptible lines, either before or after the two successive challenges.

By contrast, the bacteriological titres were significantly higher in the susceptible line than in the resistant line over the period from 24 to 48 hours upon S*a* challenge ($\mu_{susceptible}$ = 13.7 ± 1.7, $\mu_{resistant}$ = 12.2 ± 2.1, $p = 0.048$). Although it was not significant, the bacteriological titre was also higher at 48 hours upon S*e* challenge in the susceptible line when compared to the resistant line ($\mu_{susceptible}$ = 3.9 ± 4.6, $\mu_{resistant}$ = 0.86 ± 2.1, $p = 0.27$). These results suggest that bacterial clearance is more efficient in the resistant than in the susceptible line.

Furthermore, a difference in cell viability between challenges was observed in the milk cells collected by cisternal lavage 12 hours after challenge, with respectively 92.1% ± 6.1 and 55% ± 17.1 of viable cells in *Se* and *Sa* challenges ($p < 0.001$). Notably, the proportion of lymphocytes was higher after *Sa* than after *Se* infection (7.8% ± 4.9 and 4.1% ± 11, respectively, $p < 0.001$) as illustrated in Figure 2 for one representative ewe. Despite the differences observed between the challenges, the profile of cell types was not significantly different between the two divergent lines, except for monocytes/macrophages whose proportion tended to be higher in susceptible animals ($p = 0.28$).

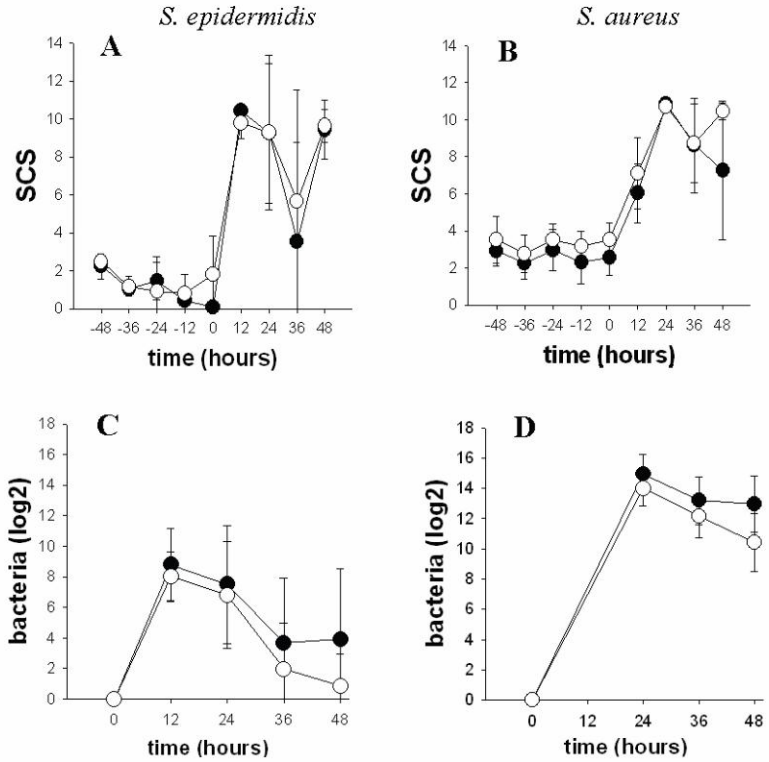


Figure 1 Evolution of SCS and bacteriology titres before and after *S. epidermidis* and *S. aureus* challenges. A and B. SCC were measured in the inoculated half-udder from 48 hours before to 48 hours after challenge. SCS were computed from the SCC with a log-2 transformation and their time evolution are drafted on the graph. C and D. Bacteriology counts were measured at the same time points (the time 12 hours post-inoculation with *S. aureus* is missing). All mammary glands were free of infection before inoculation. The positive values were transformed in score by a log-10 formula. The resistant line is represented in open symbols and the susceptible line in closed symbols. Figures A and C correspond to *S. epidermidis* and Figures B and D correspond to *S. aureus* challenge.

Comparison of the host response to *S. aureus* and *S. epidermidis* challenges

Microarray analysis and biological interpretation

The functional roles of MSC in response to different *Staphylococcus spp* were explored through gene expression profiling in the divergent sheep lines successively infected with *Se* during the first lactation, and *Sa* during the second lactation. The multifactorial ANOVA applied probe by probe identified 5,573 probes as differentially expressed according to the challenge effect (FDR of 5% and absolute fold-change (aFC) > 1.5; the FC is the ratio between *Sa* and *Se* challenges). Among these, 261 probes had an aFC > 5 (Additional file 1). The DE probe list enabled a perfect segregation between animals challenged by *Se* and *Sa* as shown by the hierarchical clustering in Figure 3. This probe list corresponded to 210 annotated genes with 95 and 115 genes that were more expressed in *Sa* and *Se* infections, respectively. The main functions of the genes expressed at a higher level in *Sa* than in *Se* infections were associated with the immune response: hematopoiesis ($p = 0.010$), cell-mediated immune response ($p = 0.009$), cell death ($p = 0.001$), immunological disease ($p = 0.001$) and inflammatory response ($p = 0.010$). Genes whose expression was higher after *Se* challenge were linked to cellular growth and proliferation ($p = 0.048$), infectious disease ($p = 0.032$), lipid metabolism ($p = 0.042$), molecular transport ($p = 0.049$) and small molecule biochemistry ($p = 0.048$) (Ingenuity Pathway Analysis - IPA - data, not shown).

Network analysis with IPA produced two networks. In the first network (Additional file 2A), which is

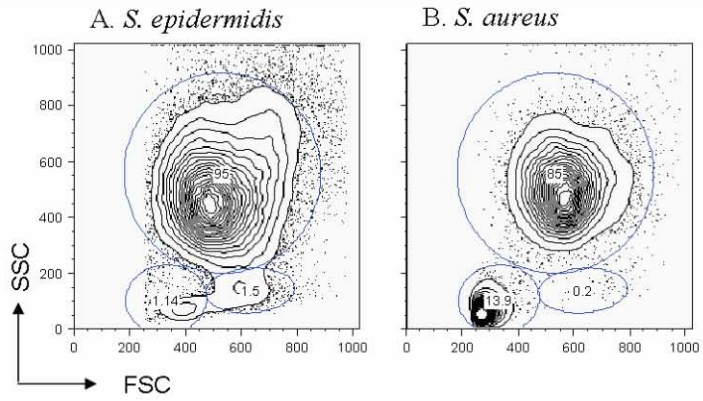


Figure 2 Cell population in the milk after *S. epidermidis* and *S. aureus* challenges. After incubation with propidium iodide, cells from cisternal lavages were analysed by flow cytometry. Dead cells were electronically gated out, and cell types (granulocytes, monocytes/ macrophages and lymphocytes) were analysed on the forward and side scatter intensity profiles. The results from a resistant ewe after *Se* (A) or *Sa* (B) are presented.

characterised by cell-to-cell signalling and interaction and cell-mediated immune response, the T cell receptor signalling pathway (with the genes: *cd247, cd3d, cd3e, cd3g, ctla4, itk, ppp3cc, rasgrp1, tra@, zap70*) and the major histocompatibility complex - MHC - pathway (with six sub-units: *dma, dqa1* (three probes), *dqa2* (two probes), *dra*, *drb1* (two probes) and *drb3*) are highly represented. In a second network, defined by inflammatory disease and response and haematological disease, both the IL1 receptor pathway and the TNF pathway are well represented with *il1r1, il1rap* and *irak4*, and *traf2-3-5* respectively (Additional file 2B).

Real-time qPCR validation of the differentially-expressed genes between Sa and Se challenges

Real-time qPCR was used to confirm the gene expression differences between the two challenges. The most expressed gene in *Se* challenges was *cpb2*. We also examined the differential expression of chemokine (C-C motif) receptor 3 (*ccr3*) and interleukine 1 receptor type II (*il-1r2*) for their role in pathogen detection, as well as myxovirus resistance 2 (*mx2*) and granzyme H (*gzmh*) for their role in immune response. Hence, five genes were selected, three of which were more expressed in the *Sa* condition (*ccr3*, *gzmh* and *mx2*) and two in the *Se* condition (*cpb2* and *il-1r2*). Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (*cxcl10*) was added to this gene list since it is known to induce T cell recruitment in inflamed tissue, and because it had been discarded from the microarray analysis due to missing data (data not shown). The differential expression between the two challenges was significantly ($p < 0.05$) confirmed for five out of the six genes (Table 1). Among those genes, the expression of *cxcl10* was 60-fold higher in *Sa* than in *Se* challenges. Although not significant ($p = 0.12$), the expression of *gzmh* was higher in the *Sa* than the *Se* condition (Table 1).

Comparison of gene expression profiles between mastitis resistant and susceptible lines

Microarray analysis

Using a multifactorial ANOVA model applied probe by probe, 57 probes were shown to be significantly DE between the resistant and susceptible lines (FDR 5% and aFC > 1.5) (Table 2). These probes corresponded to 52 annotated genes, with 33 and 19 genes expressed at a higher level in the resistant and susceptible line, respectively. This list of 52 genes is further named as the "main list". Out of the 33 genes with higher expression in the resistant line, eight had a FC ≥ 2 (*cryl1, tp53, a non-classical mhc*-I, *slc40a1, eif4ebp1, ppapdc1b, slc46a3* and *loc784517*). Only three out of the 19 genes that were expressed at a higher level in the susceptible line had an aFC > 2 (*gtpbp4, mapre1, tmem87b*).

As the gene expression of MSC response differs between challenges with two different *Staphylococcus* species, the line effect was also analysed independently within each challenge. The lesser amount of data in separate analyses made it necessary to loosen the significance threshold to find differentially expressed genes within *Se* or *Sa* challenges. Accordingly, a total of 152 probes (138 annotated genes) was considered to be DE between the lines after *Se* challenge and 235 probes

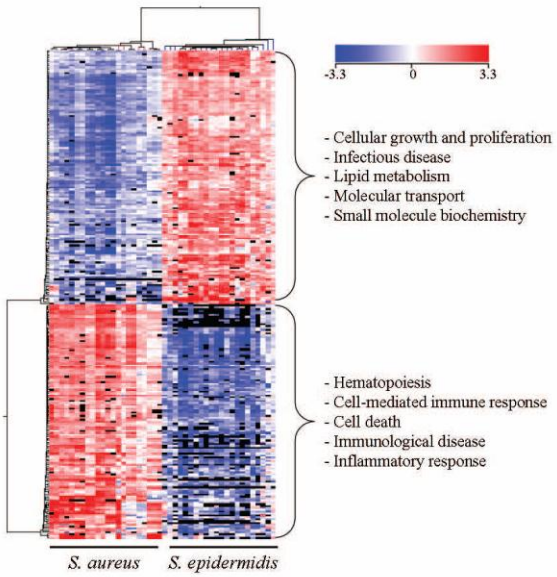


Figure 3 Heatmap of differentially expressed probes in samples from *S. epidermidis* and *S. aureus* challenges. Hierarchical clustering was performed using Pearson-centred unsupervised statistics with GeneSpring®. Gene expression intensities are in rows (n = 261, FDR q-value < 0.05 and aFC > 5). Each column represents a sample. The level of gene expression is proportional to the colour scale. The genes in the top part of the graph are over-expressed in *Se* when compared to *Sa* samples, whereas it is the contrary for the bottom part of the graph. The cluster tree of the genes (left) illustrates the nodes of genes co-regulated in each *Staphylococcus* infection and their main functions are indicated. The cluster tree of samples above the heatmap graph enabled a perfect discrimination between *S. aureus* and *S. epidermidis*-challenged samples.

(204 annotated) after *Sa* challenge (p-value ≤ 0.01 and aFC > 1.5) (Additional file 3). The latter two lists were compared to each other and also to the main list (57 probes) by generating a Venn diagram (Figure 4). Nine genes (*bola-nc1, ccdc125, eif4ebp1, kdm4b, mapre1, ppapdc1b, ppil3, timm8a, tmem87*) and also *loc784517* and an unannotated probe were common to the three lists. Forty other genes belonged to the Main List and one of the two single-challenge lists (Figure 4).

Table 1 RT-qPCR results for the differentially expressed genes between *S. aureus* and *S. epidermidis* challenges

Gene	*S. aureus*	*S. epidermidis*
CXCL10	91.46 ± 70.08***	1.46 ± 1.79
IL1R2	0.12 ± 0.11***	2.09 ± 2.35
CPB2	0.05 ± 0.04***	1.40 ± 1.84
CCR3	6.69 ± 6.80**	1.35 ± 0.83
MX2	4.64 ± 4.75**	1.00 ± 1.07
GZMH	12.41 ± 12.12	2.98 ± 2.52

The results represent the mean ± standard deviation of the relative expression in qPCR of six differentially expressed genes identified in the microarray analyses between *Se* and *Sa* challenges. A non parametric Wilcoxon test was performed with SAS to identify the differentially expressed genes.

*** p-value < 0.01; ** p-value < 0.05.

To gain further insight into the biological signification of the differences between the resistant and susceptible lines, information from the separate analyses in *Sa* an *Se* was added to the main list. The three probe lists were pooled together (Additional file3), resulting in a super-list of 335 annotated genes (380 probes). In this list, further named as the "pooled list", 209 and 169 genes were expressed at a higher level in the resistant and the susceptible animals, respectively.

Real-time qPCR validation of the differentially-expressed genes between resistant and susceptible lines

To confirm the line effect, seventeen genes were analysed by qPCR. Genes were chosen because they belonged to the main list *(cryl1, eif4ebp1, gtpbp4, mapre1, ppapdc1b, rarα, slc40a1, tmem87b* and *tp53)*, or had been identified in *Sa* (*ccl5, itgb6, s100a2, saa2* and *tlr2*) or *Se* conditions (*capn3, psmd4* and *st3gal4*) (Table 3). Real-time qPCR confirmed the significant (p < 0.05) differential expression of eight genes (*capn3, cryl1, itgb6, psmd4, rarα, saa2, st3gal4* and *tp53*). Six

Table 2 List of the differentially expressed genes between the resistant and susceptible lines

ProbeName	Genbank	Genes	Fold change[1]	FDR	Description
A_70_P018246	FE029767	CRYL1	4.7	0.030	crystallin, lambda 1
A_70_P062021	EE803126	TP53	4.6	0.031	tumor protein p53
A_70_P001626	CN824748	BOLA-NC1	3.5	0.027	non-classical MHC class I antigen
A_70_P007316	EE851499	SLC40A1	2.6	0.046	solute carrier family 40 member 1-like iron-regulated transporter
A_70_P029426	CN822074	EIF4EBP1	2.4	0.014	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
A_70_P049136	DY522411	KIAA2013	2.2	0.024	
A_70_P054531	EE849541	PPAPDC1B	2.2	0.000	phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1B
A_70_P013986	EE808866	SLC46A3	2.1	0.040	solute carrier family 46, member 3
A_70_P010846	EE822719		2.0	0.047	
A_70_P006576		LOC784517	2.0	0.030	similar to cationic amino acid transporter 5;
A_70_P059451	EE748438	RARA	2.0	0.027	retinoic acid receptor, alpha
A_70_P066641	FE023374	CCDC125	1.9	0.019	coiled-coil domain containing 125
A_70_P019936	EE776127	KDM4B	1.8	0.023	lysine (K)-specific demethylase 4B
A_70_P038196	EE746703	SULT1A1	1.8	0.041	sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1
A_70_P031756	EE767595	YPEL3	1.8	0.040	yippee-like 3
A_70_P062891	EE747727	PIGR	1.8	0.027	polymeric immunoglobulin receptor
A_70_P021746	EE782837	ACTN4	1.8	0.040	actinin, alpha 4
A_70_P055391	DY492111	FAM100B	1.8	0.023	Family with sequence similarity 100, member B
A_70_P021086	EE826005	PCID2	1.7	0.048	PCI domain containing 2
A_70_P069621	EE856030		1.7	0.049	
A_70_P054671	EE765024	LOC781337	1.7	0.019	
A_70_P038536	EE827115	GABARAPL1	1.7	0.026	GABA(A) receptor-associated protein like 1
A_70_P022126	EE826386	RERE	1.7	0.040	similar to atrophin-1 like protein
A_70_P059286	DY500392	PLOD1	1.6	0.027	procollagen-lysine 1, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1
A_70_P064491	EE836176	SERINC3	1.6	0.040	serine incorporator 3
A_70_P024181	DQ239612	TUBA1A	1.6	0.045	tubulin, alpha 1a
A_70_P011346	EE790238	STAB1	1.6	0.041	stabilin 1
A_70_P016501	EE873028	PTTG1IP	1.6	0.030	pituitary tumor-transforming 1 interacting protein
A_70_P060561			1.6	0.030	
A_70_P042031	GO760287	VAMP5	1.6	0.041	vesicle-associated membrane protein 5
A_70_P045551	EE792489	LOC507126	1.6	0.042	basement membrane-induced gene
A_70_P033276	EE812467	PPIL3	1.6	0.019	peptidylprolyl isomerase cyclophilin-like 3
A_70_P007306	EE843558		1.6	0.030	
A_70_P019896	EE823241	UQCRQ	1.6	0.025	low molecular mass ubiquinone-binding protein (9.5 kD)
A_70_P023216	EE864116	CNNM2	1.6	0.040	cyclin M2
A_70_P066801	EE865060	DEF8	1.6	0.030	differentially expressed in FDCP 8 homolog
A_70_P049271	EE806359	GIYD1	1.5	0.030	GIY-YIG domain containing
A_70_P060881	EE824343	ZNF259	-1.5	0.040	zinc finger protein 259
A_70_P060761	EE749912	ARMC1	-1.5	0.019	armadillo repeat containing 1
A_70_P064541	EE833852	PPIG	-1.6	0.049	peptidylprolyl isomerase G cyclophilin G
A_70_P063461	FE022716	NVL	-1.6	0.040	nuclear VCP-like
A_70_P062791	EE823755	POLR2D	-1.6	0.025	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide D
A_70_P050356	EE777866	CYP51A1	-1.6	0.025	cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1
A_70_P009601	EE747016	STT3A	-1.6	0.040	STT3, subunit of the oligosaccharyltransferase complex, homolog A
A_70_P050201	FE030100	DNTTIP2	-1.7	0.040	deoxynucleotidyltransferase, terminal, interacting protein 2
A_70_P046246	EE777707	TIMM8A	-1.7	0.026	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A
A_70_P061706	EE815731	USP10	-1.7	0.045	ubiquitin specific peptidase 10
A_70_P057996	EE827511	FYN	-1.7	0.041	FYN oncogene related to SRC
A_70_P060371	EE849850	AHCYL1	-1.7	0.000	adenosylhomocysteinase-like 1
A_70_P049176	EE746595	HMGCS1	-1.7	0.013	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)
A_70_P049891	CF118151	ITGA2	-1.8	0.040	integrin, alpha 2

Table 2 List of the differentially expressed genes between the resistant and susceptible lines *(Continued)*

A_70_P034661	EE780305	HOOK1	-1.9	0.030	hook homolog 1 (Drosophila)
A_70_P011861	FE031423	MUC12	-1.9	0.033	mucin 12, cell surface associated
A_70_P055431	EE849843	FYN	-1.9	0.040	FYN oncogene related to SRC
A_70_P010631	EE756345	GTPBP4	-2.1	0.019	GTP binding protein 4
A_70_P006201	FE031048	MAPRE1	-3.1	0.014	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1
A_70_P057056	EE780570	TMEM87B	-3.5	0.030	transmembrane protein 87B

[1] In the fold-change, the enumerator is the resistant line and the denominator is the susceptible line.
ANOVA models with Line and Challenge effects were applied probe by probe with GeneSpring® (n = 57 probes, n = 52 genes, FDR q-value < 0.05, absolute FC[1] > 1.5).

others (*ccl5, gtpbp4, ppapdc1b, s100a2, slc40a1* and *tmem87b)* were close to signification ($p < 0.10$). The genes *tlr2, eif4ebp1* and *mapre1* were not significantly confirmed by qPCR ($0.20 < p < 0.30$), however the relative gene expression between resistant and susceptible was in accordance with microarray analysis (Table 3).

Clustering of the differentially expressed genes between the resistant and susceptible lines

Principal component analysis (PCA) of the probes from the pooled list revealed that the first two principal components, that represented 19% of the total variations, could separate the sheep samples into three clusters: resistant animals infected by *Sa*, susceptible animals infected by *Sa* and animals infected by *Se* (Figure 5A). The principal component 1 (PC1) explained 11.2% of the total variations and clearly discriminated the *Staphylococcus spp* within the differentially expressed genes between the lines (Figure 5A). The gene expression of *capn3* was mainly associated with *Se* challenge whereas the gene expression of *ccl5* and *cd36* was linked to *Sa* challenge (Figure 5B). The PC2 explained 7.8% of the total variations and generally tended to separate the resistant and susceptible animals whatever the challenge (Figure 5A). Gene expression of *tp53, tlr2, map3k3, selplg* and *bola-nc1* was associated with the resistant animals whereas gene expression of *plekhb2, tmem87b* and *csf3* was linked to the susceptible ones (Figure 5B).

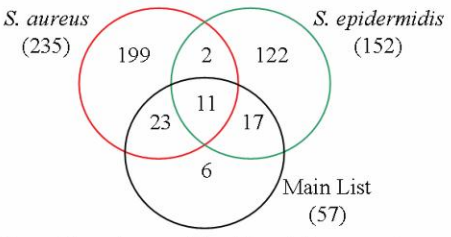


Figure 4 Venn diagram of the differentially expressed genes between the resistant and susceptible lines. The three lists of differentially-expressed genes between the lines were compared using a Venn diagram: the main list (n = 57 probes, FDR q-value < 0.05, aFC > 1.5), and the list from the single-challenge analysis *S. aureus* and *S. epidermidis* (t-test, $p < 0.01$, aFC > 1.5, $n_{Sa} = 235$ probes and $n_{Se} = 152$ probes, respectively). A total of 380 probes are represented.

GO and pathway analysis of the differentially expressed genes between resistant and susceptible lines

Additional biological information was obtained using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID v6.7) with human ortholog gene names - HUGO nomenclature (n = 306 out of 335 genes recognized by DAVID). First, Gene Ontology (GO) analysis of the biological process terms was performed. The up-regulated genes in the resistant line showed a significant enrichment of leukocyte adhesion and activation, cell death regulation, intracellular signalling cascades and negative regulation of macromolecule metabolic processes and catalytic activities (Additional file 4). On the contrary, the down-regulated genes showed a significant enrichment in positive regulation of inflammatory response ($p = 0.029$) (Additional file 4). Both up and down-regulated genes showed an over-representation of genes involved in the regulation of transcription and RNA maturation and in cell motion (Additional file 4).

Two BIOCARTA pathways were well-represented: apoptotic signalling in response to DNA damage ($p = 0.029$, with *akt1, eif2s1, cycs, tp53*), and adhesion and diapedesis of granulocytes ($p = 0.087$, with *csf3, selp, selplg*). Four KEGG pathways were also identified: lysosome ($p = 0.010$, with *tcirg1, sgsh, cd68, smpd1, ctsd, ctsa, ctsb, fuca1*), adipocytokine signalling pathway ($p = 0.012$, with *akt1, cd36, mapk8, acsl4, acsl3, acsl5*), hematopoietic cell lineage ($p = 0.032$, with *csf3, cd36, itga5, cd59, itga2, csf1r*) and focal adhesion ($p = 0.054$, with *akt1, lama3, ccnd3, actn4, itga5, fyn, itgb6, itga2, mapk8*).

Gene network analysis of the differentially expressed genes between resistant and susceptible lines

Systemic identification and grouping of line-associated genes into biological networks was performed with IPA using HUGO names (n = 331 out of 335 genes,

Table 3 RT-qPCR of the differentially expressed genes between resistant and susceptible lines

Microarray result	Genes	All data		*Sa* data		*Se* data	
		Resistant	Susceptible	Resistant	Susceptible	Resistant	Susceptible
	CRYL1	26.50 ± 29.98**	4.65 ± 5.68	40.39 ± 37.92**	6.20 ± 6.66	12.61 ± 8.71*	3.10 ± 4.57
	TP53			4.53 ± 3.51**	1.16 ± 0.72		
	RARα	1.34 ± 0.82**	0.76 ± 0.37	0.95 ± 0.58*	0.51 ± 0.31	1.72 ± 0.90*	1.02 ± 0.20
	SLC40A1			5.07 ± 8.07*	1.29 ± 1.10		
Main List	GTPBP4			0.59 ± 0.47*	1.21 ± 0.92		
	TMEM87B			0.73 ± 0.14*	1.19 ± 0.86		
	PPAPDC1B	0.43 ± 0.39	0.81 ± 0.92	0.25 ± 0.13	0.26 ± 0.19	0.61 ± 0.50*	1.36 ± 1.05
	EIF4EBP1	1.54 ± 0.80	1.27 ± 0.75	1.93 ± 0.75	1.49 ± 1.01	1.14 ± 0.67	1.05 ± 0.33
	MAPRE1			0.87 ± 0.57	1.16 ± 0.76		
	SAA2			0.33 ± 0.31**	1.86 ± 2.30		
	ITGB6			0.42 ± 0.31**	1.49 ± 1.49		
***Sa* list**	S100A2			0.58 ± 0.39*	1.28 ± 0.94		
	CCL5			0.55 ± 0.36*	1.35 ± 1.02		
	TLR2			2.04 ± 2.17	1.09 ± 0.47		
	CAPN3	3.63 ± 2.71**	1.52 ± 0.98	4.07 ± 3.23	1.66 ± 0.81	3.19 ± 2.28*	1.38 ± 1.18
***Se* list**	PSMD4	0.82 ± 0.28**	1.06 ± 0.31	0.96 ± 0.27	1.08 ± 0.33	0.67 ± 0.22**	1.04 ± 0.32
	ST3GAL4	1.56 ± 1.31**	0.82 ± 0.50	0.96 ± 0.73	0.54 ± 0.37	2.16 ± 1.55**	1.10 ± 0.48

The results represent the mean ± standard deviation of the relative expression in qPCR of seventeen differentially expressed genes identified in the microarray analyses with all data (main list), *S. aureus* (*Sa* list) or *S. epidermidis* data (*Se* list). qPCR were performed with *Sa* or *Se* samples or with both *Sa* an *Se* samples (All data). A non parametric Wilcoxon test was performed with SAS to identify the differentially expressed genes. ** p-value < 0.05; * p-value < 0.10.

recognized by IPA). Five networks were obtained with a score superior to 30. Twenty-two to twenty-eight genes were involved in each network. The two first networks are presented in the Figure 6. Network 1 is characterised by lipid metabolism, molecular transport and small molecule biochemistry (Figure 6A). It presents *tp53*, the second most up-regulated gene in the resistant line (Table 2 and Additional file 3), as a hub which means that *tp53* regulates or is regulated by a large proportion of the identified DE genes (Figure 6A). Network 2 is defined by cellular movement, haematological system development and function, and immune cell trafficking

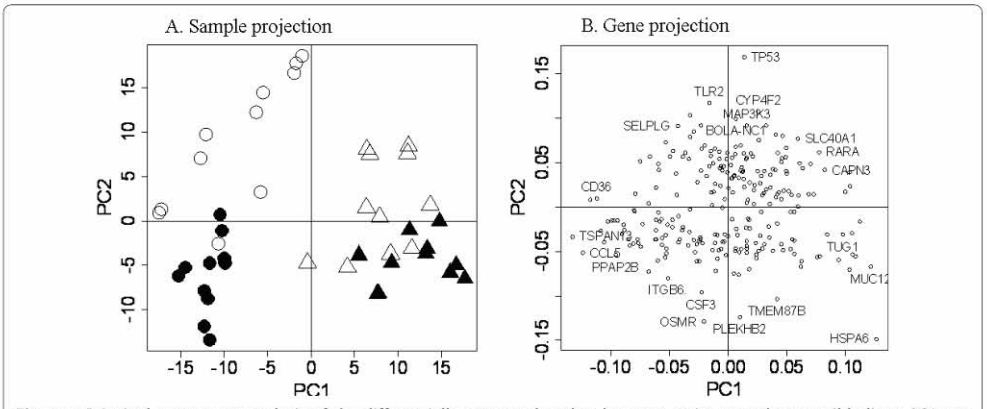


Figure 5 Principal component analysis of the differentially-expressed probes between resistant and susceptible lines. PCA was performed with R on the 380 probes that are differentially expressed between the lines from the pooled list. (A) All samples from the four conditions - Low-SCS animals infected by *Se* (open triangle), Low-SCS animals infected by *Sa* (open circle), High SCS animals infected by *Se* (closed triangle) and High SCS animals infected by *Sa* (closed circle) were separated based on Line-Challenge along the principal component 1 (PC1) and PC2 axes. PC1 explained 11.2% of the total variations and mainly discriminates the challenges whereas the PC2 explained 7.8% of the total variations and segregates between the lines. (B) The 380 probes were projected on PC1 and PC2.

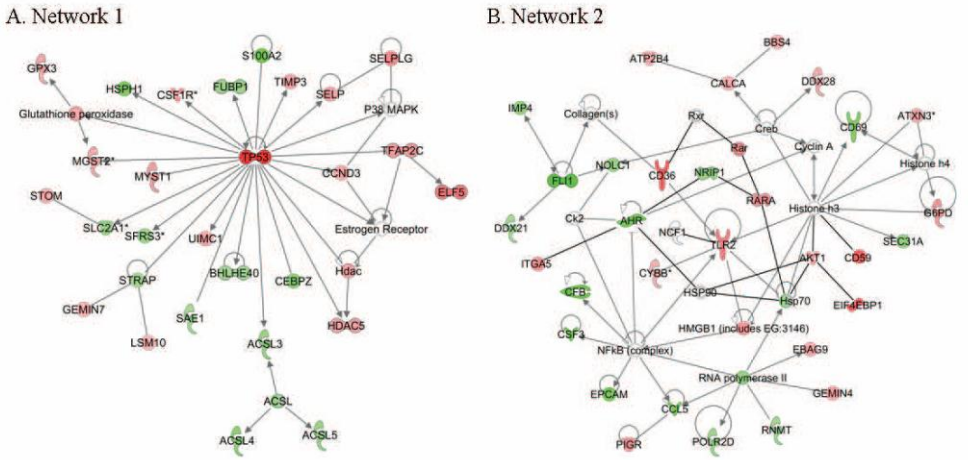


Figure 6 Network analysis of the differentially-expressed genes between resistant and susceptible lines. Network analysis was performed with IPA (n = 335 genes, n = 287 IPA network eligible genes). The colours represent the expression level: the genes over-expressed in resistant animals are in red whereas the down-regulated genes are in green. (A) Twenty-eight genes belonged to network A that scores 42. The main biological functions are lipid metabolism, molecular transport and small molecule biochemistry. (B) Thirty-five genes are present in network B. The original network involved twenty-six genes and scores 39. It is characterised by cell movement, haematological system development and function, and immune cell trafficking. We could add seven DE expressed genes of interest (*akt1, cd59, eif4ebp1, hspa6, itga5, osmr* and *rarα*) to this network through five other genes, with direct relationships with genes involved in this network.

(Figure 6B). It highlights a central position for *tlr2*, linked to *cd36*, that are of major importance for pathogen recognition. Other genes were included in this network *eif4ebp1* and *itga5*, *nfkb* (immune response), *ccl5* (diapedesis) and *rarα* and *ahr* involved in the retinoic acid pathway (Figure 6B).

Communal transcription factor analysis

To enhance the understanding of the genetic basis of the DE genes, the potential transcription factors that can regulate these genes were investigated by looking for transcription factor-binding sites (TFBPS) that were over-represented in the promoter sequences of the DE genes. Using 260 genes recognised in InnateDB, significant enrichment was demonstrated for 11 transcription factors with a $p < 0.05$ (CEBPB, PAX5, E4F1, CREB1, ETV7, HIF-1, SMAD1, FOXO4, NRF-2, NRF1 and NFIC), and nine other transcription factors with $p < 0.10$ (AP-1, ETS1, 120-kDa CRE-binding protein, FOXO1A, NKX2-5, ATF, ATF3, XBP1 and PBX1). Furthermore, the transcription factors AHR, which showed lower expression levels in the resistant animals, and CEBPA, which showed higher expression levels, could bind the promoters of thirty-three and seven genes, respectively, that were more expressed in the susceptible line ($p = 0.07$ and $p < 0.1$, respectively). TP53, which showed higher expression levels in the resistant animals, could bind fourteen up-regulated genes ($p = 0.16$).

Discussion

Gene expression of milk somatic cells

In the present study, we compared the gene expression in MSC upon mammary challenge. Up to date, only a small number of studies have analysed the transcriptome of MSC, by comparing infected and non-infected glands [16,17]. MSC populations, however, are highly modified after infection: whereas mononuclear cells are preponderant in healthy glands [23], neutrophils represent the main cell type in infected glands [4,13,24]. Because of the profound modifications within the MSC population, the comparison of MSC gene expression before and after challenge should be interpreted with caution as they are the result of mixed molecular and cellular effects. Hence, our study focused on the transcriptomic differences within homogeneous cell populations between the lines upon challenge. It is well known that the development of *S. aureus* in any tissue implies host cell apoptosis [25,26], and so RNA breakdown occurs. To circumvent the difficulty, cisternal lavage was performed after emptying the mammary gland to gather recently emigrated and living MSC. This protocol enabled us to recover a higher proportion of living cells

and obtain good quality RNA, despite the short half-life of milk neutrophils.

Physiological mechanisms that are mobilised during the early response are considered as determinant for the outcome of IMI. Therefore, we selected an early time point (12 hours) for cell collection, during the first wave of cell recruitment, just before the bacteria titres diverge, and the side effects, on the mammary tissue due to bacteria growth, appear. In addition at 12 hours post inoculation, the milk cell population was much more homogeneous than at later time points, *i.e.* 95% of the cells were neutrophils. Therefore, despite the small number of animals used and the fact that only one time point was considered, we identified lists of significant and biological relevant differentially expressed genes in MSC. The results gave some insight into the differential response of the host to IMI according to the mastitis causing pathogen and its genetic background.

Differences between *S. epidermidis* and *S. aureus* challenges

Although genetically *Sa* and *Se* are closely related [27], the host cell viability after *Sa* challenge was lower than after *Se* challenge and the proportion of T-cells was higher. This is correlated with the striking differences in the gene expression profiles of infected MSC at twelve hours post-inoculation. Indeed, 5,573 genes were differentially expressed in MSC infected either by *Sa* or *Se*. The greatest absolute fold changes (aFC) were achieved when *Sa* was compared to *Se* - 91% of the genes with an aFC > 10 were over-expressed after *Sa* challenge. A high number of DE genes underlined T cell recruitment after *Sa* challenge. Indeed, two major genes that are up-regulated after *Sa* challenge are involved in T-cell responses: the chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (*cxcl10*) [28] and the cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 gene (*ctla4*). The up-regulation of *ctla4* in MSC of cows with chronic *Sa* mastitis has already been reported [13]. In addition, the components of the chemokine signalling and cell adhesion molecule pathways were over-represented after *Sa* challenge. These pathways play important roles in blood neutrophil arrest and diapedesis across the endothelium [6]. Furthermore, cytokine-cytokine receptor interactions are also noticeable and cytokines are known to tightly regulate neutrophil functions during inflammatory response [6]. Thus, pro-inflammatory cytokines lead to the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway (MAPK) in neutrophils and promote leukocyte recruitment to inflammation sites. Furthermore, *S. aureus* exerted an oxidative priming and a pro-apoptotic effect on neutrophils, contrary to *S. epidermidis* strains [29]. *S. aureus* cytotoxicity mainly depends on proteases, hyaluronidases, lipases and nucleases that facilitate tissue destruction, membrane-damaging toxins that cause cytolytic effects in host cells, and superantigens that contribute to the symptoms of septic shock [30]. Moreover, three sub-units of the major histocomptibility complex (MHC) class II (DQA1, DQA2 and DRB1) were up-regulated after *Sa* challenge suggesting recruitment of antigen-presenting cells or activation of T cells. The higher proportion of lymphocytes after *Sa* challenge might be partly responsible for the large variations of gene expression observed between *Sa* and *Se* challenges.

Altogether, the gene expression profiles of MSC upon challenge with two distinct pathogens differed widely in relation with the severity of the mastitis, bacterial counts and milk SCC [7,22]. Furthermore, it should be noted that all the differences of MSC gene expression infected either by *Sa* or *Se* might not be caused by the *Staphylococcus* species. Actually, other factors may explain these differences since the animals were infected twice, and a memory response could have developed consequently to the first challenge. However, this is improbable due to the recurrence of infections frequently reported in apparently susceptible animals and the poor effect of vaccination with living bacteria on the occurrence and severity of subsequent infections. The animals' physiological conditions (age, effect of previous infection, *etc.*) at the second lactation could also influence the pattern of response. So partial confusion with other effects not related to the bacterial strain cannot be totally excluded.

Transcriptome differences associated with mastitis resistance or susceptibility

To our knowledge, this is the first report of a high-throughput gene expression profiling of MSC from animals genetically selected for their resistance to mastitis. Although, Griesbeck-Hilch *et al.* [31] have already compared the expression of a few genes in mammary epithelial cells (MEC) of mastitis resistant and susceptible cows selected on the basis of the breeding values for SCS or genetic markers. The genetic lines used in this study were created from a one-generation selection of Lacaune dairy ewes based on their parents' breeding values for SCS. The divergence achieved was high, *i.e.* 3 genetic standard deviations [22], and was confirmed over successive cohorts raised in the same flock between 2005 and 2009 (RR, unpublished data). The selection criterion used is the SCC, it is based on few repeated measures (usually 3 to 4 times per lactation) and is able to discriminate chronically infected animals from non-infected animals. SCC-based selection, therefore, does not give any information about the underlying mechanisms selected, but previously published results have shown that such selection improves resistance to IMI [22].

In the present study, whereas milk SCC were not significantly different between the lines in the early course

of *Staphylococcus* challenges, bacteria titres were lower in the resistant line than in the susceptible line. The difference between lines increased from 12 to 48 hours upon challenge. Accordingly, differentially expressed genes in milk cells at twelve hours post-inoculation might provide useful information about the early mechanisms underlying the genetic control of mastitis in the resistant line, that portend differences of the mastitis issue that were later observed.

Cytokines and chemokines

Some soluble factors such as chemokines form gradients from the blood towards infected sites and can enhance neutrophil attraction and migration. In our study, we found no expression differences for major chemokines such as *il-1β*, tumour necrosis factor alpha (*tnfα*), *il-6* and *il-8* (also named *cxcl8*, one of the main chemoattractants for neutrophils [4]), contrary to Griesbeck-Zilch in MEC of mastitis resistant cows selected on QTL alleles [31]. However, integrin beta 6 (*itgb6*), serum amyloid A 2 (*saa2*), a marker of acute inflammation [32,33], S100 calcium binding protein A2 (*s100a2*), a member of the S100 family that is highly correlated with somatic cell count [10], and the chemokine C-C motif ligand 5 (*ccl5*, also named *rantes*) that triggers adhesion and transmigration of blood monocytes to/through endothelial cells were expressed at higher levels in susceptible animals. On the contrary, the expression of calpain 3 (*capn3*) was higher in resistant animals. This protein was shown to play a role in resting neutrophils and to operate as a negative regulator of protrusion and migration [34]. In the present study, although pro-inflammatory molecules have been widely shown to play an important role in neutrophil recruitment and IMI outcome [7,14,28], their expression patterns at 12 hours post-challenge were contrasted in resistant and susceptible lines and not correlated to differences in milk cell concentrations.

Neutrophil diapedesis

Furthermore, a group of genes related to cell adhesion and movement, including ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4 (*st3gal4*), but also activated leukocyte cell adhesion molecule (*alcam*), integrin alpha 5 (*itga5*), selectin platelet (*selp*) and its ligand (*selplg*), were over-expressed in the resistant line. *st3gal4* is involved in the synthesis of selectin ligand [35]. The selectins are fundamental for the attachment of neutrophils to the endothelial cell surface [4,36] before diapedesis. These results suggest that neutrophil diapedesis might be more efficient in the resistant line.

TLR pathways

The genes *cd36* and *tlr2* that were expressed at a higher level in resistant animals and that are central in the network analysis collaborate together in the Toll-like receptor (TLR) signalling pathway [37]. TLR2 is dedicated to Gram-positive bacteria recognition [38] and it may enhance the activation of neutrophil phagocytosis [39]. Griesbeck-Hilch *et al.* [31] also found that *tlr2* was up-regulated in mastitis resistant cows selected on markers for one QTL. The TLR2 signalling pathway may activate a cascade of intracellular events that may initiate the transcription of pro-inflammatory cytokine genes through the ERK/MAPK signalling pathway with consistent up-regulation of *eif4ebp1* and *itga5* in the resistant animals. This pathway is involved in oxidative stress which has been shown to contribute to the variability of susceptibility to IMI in cattle [6]. Altogether, the modification of TLR2 and MAPK signalling pathways might be responsible for a higher uptake of bacteria by phagocytes, and therefore might contribute to the more efficient clearance of the infection in the resistant line.

Transcription factors

A noteworthy fact is that considerable differences between lines were related to transcriptional activity within MSC. The activator protein 1 (AP-1) transcription factor is considered as an immediate-early response gene and is thought to be involved in a wide range of transcriptional regulatory processes linked to cellular proliferation and differentiation. RARα, TP53, and AHR were also transcription factors of interest.

RARα, the alpha receptor of retinoic acid, a compound derived from vitamin A metabolism, is a nuclear receptor. It can affect several aspects of innate immunity by enhancing the function of neutrophils, macrophages and natural killer cells [40]. It has also been shown to play a role in helping the development of T helper cells, B-cells and, thus antibody-mediated response [40], and more recently in modulating antigen-presenting cells [41]. Retinoic acid metabolism has been shown to play a part in IMI outcome, and dietary vitamin A supplementation has been reported to have a protective effect against experimental *S. aureus* mastitis in mice [42]. Moreover, we found that the aryl hydrocarbon receptor (*ahr*) was under-expressed, which is consistent with several studies that have demonstrated its interaction with RA-signalling pathways [43]. The involvement of AHR in the control of inflammatory responsiveness has been reported previously [44]. To our knowledge the role of TP53 in the response to bacterial infection has yet to be studied whereas it has been shown elsewhere to be associated with mastitis infected quarters [45]. *tp53* was the gene that displayed the second highest ratio between lines and was over-expressed in the resistant line; it was highly associated with resistant animals in PCA and was represented as a hub in IPA networks since it interacts with numerous other DE genes. *tp53* can be regulated by S100A2 proteins [46] and JNK [47], and *in vitro* it was shown to regulate TNFα and other cytokines [48]. TP53 has been largely studied in the cancer context for

its role in cell cycle arrest, apoptosis, DNA repair and production of antioxidants [49]. Furthermore, TP53 has already been shown to play a pivotal role in determining cellular response to stress via NFκB [50] and TNFα [48]; it may also enhance transcription of the complement regulator CD59 [51]. These observations suggest an important role of TP53 during bacterial infections.

Granulopoiesis, cell proliferation, apoptosis

In addition, particular cell functions such as granulopoiesis, cell proliferation and apoptosis seemed to explain some of the differences between the lines. Strong increases in neutrophil efflux from the bone marrow are followed by intense granulopoiesis and efflux of band cells that will later be recruited at the infection site: these cells may show higher transcriptional activity than mature neutrophils. Gene expression analysis demonstrated that the transcription factors CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha (CEBPA) and RARα were up-regulated in the resistant line. CEBPA is crucial for the differentiation of granulocytes [52] and RARα has been shown to be directly involved in some aspects of the immune response by enhancing granulopoiesis [53,54]. Collins *et al.* (60) showed that RARα can enhance granulocytic differentiation through a molecular pathway that is independent of CEBPA [55] suggesting that two different pathways stimulating granulopoiesis were up-regulated in the resistant line.

Furthermore, a number of genes differentially expressed between the sheep lines was related to cell proliferation and apoptosis, e.g. *mapre1, znf259, gzmh cryl1* and *tp53*. These genes exhibited amongst the highest expression differences between lines. The genes encoding *tp53*, and the lambda-crystallin protein (*cryl1*) were expressed up to five times more in the resistant line. Recently, Cheng *et al.* (61) evidenced association between the expression of CRYL1 and inhibition of cellular proliferation and cell growth [56]. This is in agreement with the decreased expression of both microtubule associated protein RP/EB family member 1 (*mapre1*) and zinc finger protein (*znf259*) in resistant sheep. Indeed, ZNF259 (homologous to ZPR1) has previously been shown to accumulate in the nucleus of proliferating cells [57] and MAPRE1 has been associated during mitosis, with the centrosomes and spindle microtubules. Apoptosis is a critical process necessary to limit or terminate inflammation [6,58] and has previously been shown to be of importance in the response to *S. aureus* by Lutzow *et al.* [10]. The gene expression of *tp53* has been shown to increase in neutrophils during apoptosis [59]. These results suggest that cell proliferation is limited and apoptosis increased in resistant sheep as compared to susceptible sheep. Altogether data support the hypothesis that, as a consequence of apoptosis/granulopoiesis, the cell turn-over may be enhanced in the resistant line when compared to the susceptible line.

Collectively, these findings highlight leukocyte adhesion and cell migration, pathogen recognition through the TLR2 signalling pathway, and cell turn-over with the balance between apoptosis and granulopoiesis as possible mechanisms to explain a higher susceptibility or resistance to intramammary infection. Nevertheless they probably give only a partial view as other cell types and compartments may be involved (epithelial cells, dendritic cells, lymphocytes, *etc*). Also, other conditions (bacteria strain, time point) might have provided some different results. However, these results advocate the use of our differentially expressed gene list as a benchmark to more detailed genetic studies, including genome co-localisation of resistance to mastitis using QTL analysis as reviewed previously [19,22-25] and polymorphism studies.

Conclusion

Resistance to mastitis is the consequence of a fine-tuning of immune and inflammatory processes in a complex network of cell and gene interactions. Our study has highlighted some of the possible mechanisms, such as pathogen recognition and neutrophil extravasation leading to improved immune responses against *Staphylococcus* species and consequently, lower susceptibility to infection. The list of the differentially expressed genes between the resistant and susceptible animals provides relevant information for the identification of candidates for the genetic basis underlying resistance to mastitis. It paves the way for further genetic and mechanistic studies.

Methods

Animals, experimental challenges and sample collection

To provide enhanced insight into the genetic mechanisms involved in SCS-based selection, two groups of six Lacaune ewes were challenged twice with *Staphylococcus* bacteria. Briefly, primiparous ewes were issued from divergent selection based on extreme breeding values for the somatic cell score (SCS) [22]. On a general basis, the Low SCS ewes are characterised by lower mastitis susceptibility than the High SCS ewes [22]. *Staphylococcus* genus was chosen since it is the most prevalent etiological group in dairy sheep [1] and in SCS lines as previously shown [22]. *Se* and *Sa* bacteria used for inoculation were isolated from ovine chronic mastitis.

After the first lambing, the ewes were inoculated with 10^3 cfu of *Se* in a healthy half udder. To clear the infection, local and systemic treatments with antibiotics were applied at the end of the survey. One year later, the same ewes had been mated again, and shortly after the

second lambing, they were inoculated with 10^3 cfu of *Sa* in the opposite half udder.

Milking was performed by hand twice a day. Milk samples were collected for milk somatic cell count (SCC) every 12-hours from 48 h before to 48 h after the inoculation. SCC was determined using a Fossomatic counter. The score of SCC (SCS) was calculated with the following formula: SCS = 3 + $\log_2$ (SCC/100,000) [60]. Samples collected aseptically after inoculation were used for bacteriology counts (except the 12 hours post *Sa* inoculation).

Bacteriological analyses were performed at the Veterinary School of Toulouse (UMR 1225 laboratory) by conventional techniques according to International Dairy Federation (1981) guidelines, with a few additions that have already been described in *Rupp et al.* [22]. The bacteriology titre was calculated by a log-10 transformation of the data.

Twelve hours after challenge, mammary glands were emptied and teat ends were disinfected with 70% alcohol. Then, MSC were recovered by cisternal lavage with 100 ml of a saline solution. After centrifugation, cell pellets were resuspended in TRIzol reagent and stored at -80°C until further processed. In parallel, cells were immediately processed for flow cytometry analysis. After incubation with propidium iodide (1 μg/ml final concentration). Data were collected on at least 20,000 events on a FACSCalibur (BD Biosciences) and analysed with FlowJo software.

Statistical analyses of SCS and bacteriological titres were performed with ANOVA applied to mixed models (SAS® v.9.1), and with a non-parametric Wilcoxon test for viability and milk cell population.

Experiments were performed according to French (Agreement number N°31-2010-67) and European rules, and following the regulations of the Animal Ethics Committee for INRA (France).

Microarray analysis

RNA extraction, amplification and labelling

Total RNA was extracted from the 24 cell samples - six ewes from two lines for two challenges - using a typical phenol/chloroform extraction method with Trizol reagent (Invitrogen). Extracted RNA was further purified on Qiagen RNeasy columns (Mini kit, Qiagen). RNA quality was assessed using an Agilent 2100 BioAnalyzer and the RIN (RNA Integrity Number) index was above 7 for all samples.

Hybridisation, scanning and raw data storage

For each of the 24 samples, 200 ng of RNA was converted into double-stranded cDNA using the Amino Allyl Message Amp II aRNA amplification procedure (Ambion kit). cDNA was then labelled with Cy3 and Cy5 to obtain 48 dyed samples. Samples were hybridised in a two-colour dye-switch experimental design (GenoToul, France, http://biopuce.insa-toulouse.fr/Maquette/en/) on 22 microarrays of the ovine oligonucleotide 019921 Agilent slide (Agilent Technology).

Chips were hybridised with labelled cDNA at 65°C for 17 hrs and then washed according to the Agilent Technologies protocol. Intensity values were recorded with a 4000B Axon scanner. Two channel images were imported into the Agilent Technology Feature Extraction software for feature spot finding and alignment, and data were normalised with a Loess procedure.

Annotation of the ovine microarray

A total of 15,008 different probes are present on the Agilent ovine slide, but only 1,656 genes were annotated by Agilent (version available in January 2010). Moreover, 8,847 genes were identified as Human ortholog Gene Nomenclature Committee (HGNC) by SIGENAE (http://www.sigenae.org/sheep oligo annotation version 5 of 2009/11/10) [61]. More information about unannotated probes was obtained through the Basic Local Alignment Search Tool programme on the NCBI website (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) and the ENSEMBL website (http://www.ensembl.org/index.html). After this annotation phase, only a few focus probes remained unannotated.

Processing data and statistical analysis of microarray data

The Feature Extraction result files (.txt) were imported into GeneSpring® GX 11 as single-channel values. Gene expression was analysed probe by probe using an intensity-based model - *i.e.* working on the intensity of spots and not on the ratio between conditions. This way of analysing two-colour-microarray data was shown to enhance the reproducibility of results and the sensitivity of the detection of DE genes [62]. Data were filtered according to spot intensity, saturation and uniformity. Genes were flagged individually for each of the four conditions: low SCS *Sa*, low SCS *Se*, high SCS *Sa* and high SCS *Se*. Only probes that were positively flagged in all samples for at least one condition were conserved for further analysis in order to keep only genes that were very representative of one condition (n = 9,098). Then data were normalised across arrays with the GeneSpring® "scale to median" procedure.

Initially, a two-way ANOVA was performed for each probe to identify DE genes between the two *Staphylococcus* challenges (*Sa* and *Se*) and between the two divergent sheep lines (Low SCS and High SCS). The interaction between the Challenge and the Line effects was tested but was not significant; therefore, it was removed from the statistical model. The p-values of the tests were corrected with a 5% false discovery rate (FDR) with Benjamini-Hochberg [63] and genes with an absolute fold-change (aFC) superior to 1.5 were considered as differentially expressed. For the Line effect, FC represents the ratio between Low and High SCS; for the Challenge effects, it symbolises the ratio between *Sa* and *Se*. The experiment was deposited in GEO at the

identifier number GSE24925 (BioArray Software Environment - version SIGENAE).

As 5,573 genes were differentially expressed for the Challenge effect, a second analysis was performed considering only samples infected by one *Staphylococcus* strain to focus on genetic differences between the lines. The whole raw data set was divided into two subsets: MSC from *Sa* and *Se* infections respectively. Data filtering and normalisation were performed as previously for the ANOVA model and 7,452 and 8,561 probes were retained for statistical analysis of the *Se* and *Sa* challenges, respectively. Then, an unpaired Mann Whitney test was performed probe by probe. Considering a 5% FDR no probe was identified as significantly differentially expressed between the lines probably because of the weak number of animals (six in each line). However to further explore the differences of mastitis susceptibility, the p-value threshold of statistics was relaxed. The p-value was rounded to two decimal places, then, the genes with a p-value ≤ 0.01 and an aFC greater than 1.5 were considered as differentially expressed.

Expression profiles for DE genes were classified using the hierarchical clustering algorithm in GeneSpring® based on Pearson-centred gene distances to visualise the differences between the two conditions. They were also represented in principal component analysis (PCA) with the centred data in R (v. 2.9.0) to identify the most important genes to explain mastitis resistance or susceptibility.

Biological interpretations of the differentially expressed genes

Three software programmes were used to interpret the lists of focus genes obtained from statistical analysis: Ingenuity Pathway Analysis (IPA), Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID v6.7) [64,65] and Innate Data Base (InnateDB) [30].

IPA software (version 7.5, http://www.ingenuity.com/) was used to generate biological networks from a list of selected genes and to document the functions of these genes and the canonical pathways in which they are involved.

Gene Ontology analysis was performed using DAVID (http://david.abcc.ncifcrf.gov/) and led to the establishment of relationships between genes with similar biological functions. Transcription factors that potentially regulate several focus genes were identified with InnateDB (http://www.innatedb.com).

Reverse transcription

cDNA was generated from 300 ng of clean total RNA from all samples using the Superscript III First Strand Synthesis System Kit (Invitrogen) following the manufacturer's instructions with random hexamer primers and a RNaseH treatment step.

Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

The expression of some differentially expressed genes was verified by qPCR. Primer pairs were designed using Primer3 [66] based on the relevant ovine sequences and verified using Primer Express® software. Their specificity was checked with BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Primers were synthesised commercially by Eurogentec. For genes for which no ovine sequence was available, a comparative gene alignment of bovine, human, rat and mouse sequences was made and primers were then designed on the most conserved regions between the species. Absence of primer dimers was verified using melting curve analysis and the efficiency of the amplification was measured before use. The couples of primers used in qPCR experiments are listed in Additional file 5. qPCR reactions were performed on a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). To validate genes differentially expressed between resistant and susceptible animals, qPCRs were performed either on both *Sa* and *Se* samples or only on *Sa* samples. All assays were carried out in duplicate and each reaction contained 5 μl of diluted cDNA (1:50) with 2.5 μl (0.5 μm) of each forward and reverse primer along with 12.5 μl of Power Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

Specific amplification of each target was confirmed by melting curve analysis. Measured Ct values were exported from SDS software to Excel for data analysis. RT-qPCR technical replicates of samples were averaged. The stability of 7 housekeeping genes, previously cited in the literature, was checked in the 24 samples and data was analysed using GeNorm software [67]. The four most stable genes (*rp19, hprt, sdh* and *gapdh)* were selected for normalisation of RT-qPCR. Fold changes were calculated by the delta delta Ct method normalised to the four housekeeping genes [67] with R (version 2.9.0). Statistical analysis was performed using an exact non parametric Wilcoxon test with SAS (version 9.1).

Additional material

Additional file 1: List of the differentially-expressed genes between *S. aureus* and *S. epidermidis* challenges. Analysis was performed with GeneSpring®. The enumerator of the FC represents the *Sa* samples and the denominator the *Se* samples. Genes were considered as differentially expressed if the FDR q-value < 0.05 and the absolute FC > 5 (n = 261 probes, n = 210 genes).

Additional file 2: Networks of the differentially expressed genes between *S. aureus* and *S. epidermidis* challenges. Network analysis was performed with IPA. Genes up-regulated after *Sa* challenge are in red whereas genes up-regulated after *Se* challenge are in green. (A). The main biological functions of the network A (molecules: 26, score: 42) are cell-to-cell signalling and interaction, cell-mediated immune response. (B). The main biological functions of the second network (molecules: 15, score 21) are inflammatory disease, inflammatory response and haematological disease.

Additional file 3: List of the differentially expressed genes between the resistant and susceptible lines. Analysis was performed with GeneSpring® (n = 380 probes, n = 335 genes). The fold change and the p-values of the three analyses are present. ANOVA stands for analysis with all data (corrected p-value with a FDR of 5% and absolute FC > 1.5); *Sa*, for analysis with only *S. aureus* data, and *Se* for analysis with only *S. epidermidis* data (p-value ≤ 0.01 and FC > 1.5).

Additional file 4: Biological process GO Terms of the differentially expressed genes between the resistant and susceptible lines. Analysis was performed by DAVID (n = 335 genes, n = 306 genes recognised by DAVID). Of the 160 and 146 up- and down-regulated genes, 126 and 119 GO terms were identified, respectively. "Count" stands for the number of differentially expressed genes in a GO Term class. "%" represents the number of genes involved in given term divided by the total number of input genes, *i.e.* percentage of input genes hitting a given term. "Hit" is the number of TF binding sites and the "Enrichment Fold" measures the magnitude of enrichment.

Additional file 5: Oligonucleotide sequences for quantitative PCR. The sequences of the couples of primers to confirm the Challenge effect are listed in the table A and the ones for the Line effect in the table B.

Acknowledgements and funding

This work was financed by the European Network of Excellence EADGENE, ANR Génanimal and APIS-GENE. The authors would like to thank all the staff of the INRA experimental facility at La Fage (UE321) for breeding the sheep lines. Authors acknowledge the technical support provided by Lidwine Trouilh for microarray experiment in Genomic platform GenoToul Toulouse-Midi-Pyrénées, and by Gaëlle Rauffet and Philippe Bardou from the Sigenae team for annotating the Agilent ovine slide and depositing microarray data in GEO, respectively.

Author details

[1]INRA, UR631, SAGA, F-31326 Castanet-Tolosan, France. [2]INRA, UMR1225, IHAP, F-31076 Toulouse, France. [3]Université de Toulouse; INP, ENVT, UMR1225, IHAP; F-31076 Toulouse, France. [4]INRA, UE321, Domaine expérimental de la Fage, F-12250, Roquefort, France.

Authors' contributions

CB carried out the microarray experiment, performed the statistical analysis and drafted the manuscript. GF and RR designed the experiment, supervised the analysis and participated in writing the paper. RR designed the divergent selection experiment. MRA bred the animals. GF supervised experimental challenges and sample collection. DB, EF, CT and CC participated in the experimental challenges. DB supervised the bacteriology analyses. EF and SB performed flow cytometry analysis. CC prepared RNA for hybridisation. CC, MT and CB hybridised the samples. MT was in charge of the RT-qPCR analysis. RR, CRG and GF helped and discussed the statistical methods implemented. All authors read, helped to edit and approved the final manuscript.

Received: 11 March 2011 Accepted: 28 April 2011
Published: 28 April 2011

References

1. Ariznabarreta A, Gonzalo C, San Primitivo F: **Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to staphylococci.** *J Dairy Sci* 2002, **85**:1370-1375.
2. Gonzalez-Rodriguez MC, Gonzalo C, San Primitivo F, Carmenes P: **Relationship between somatic cell count and intramammary infection of the half udder in dairy ewes.** *J Dairy Sci* 1995, **78**:2753-2759.
3. Sordillo LM: **Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility.** *Livest Prod Sci* 2005, **98**:89-99.
4. Paape MJ, Mehrzad J, Zhao X, Detilleux J, Burvenich C: **Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes.** *J Mammary Gland Biol* 2002, **7**:109-121.
5. Kehrli ME, Shuster DE: **Factors affecting milk somatic-cells and their role in health of the bovine mammary gland.** *J Dairy Sci* 1994, **77**:619-627.
6. Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW: **The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk.** *Vet Res* 2003, **34**:597-627.
7. Bergonier D, Berthelot X: **New advances in epizootiology and control of ewe mastitis.** *Livest Prod Sci* 2003, **79**:1-16.
8. Gunther J, Koczan D, Yang W, Nurnberg G, Repsilber D, Schuberth HJ, Park Z, Maqbool N, Molenaar A, Seyfert HM: **Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with Escherichia coli.** *Veterinary Research* 2009, **40**.
9. Pareek R, Wellnitz O, Van Dorp R, Burton J, Kerr D: **Immunorelevant gene expression in LPS-challenged bovine mammary epithelial cells.** *J Appl Genet* 2005, **46**:171-177.
10. Strandberg Lutzow YC, Donaldson L, Gray CP, Vuocolo T, Pearson RD, Reverter A, Byrne KA, Sheehy PA, Windon R, Tellam RL: **Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to *Staphylococcus aureus* infection.** *BMC Vet Res* 2008, **4**.
11. Swanson KM, Stelwagen K, Dobson J, Henderson HV, Davis SR, Farr VC, Singh K: **Transcriptome profiling of *Streptococcus uberis*-induced mastitis reveals fundamental differences between immune gene expression in the mammary gland and in a primary cell culture model.** *J Dairy Sci* 2009, **92**.
12. Pisoni G, Moroni P, Genini S, Stella A, Boettcher PJ, Cremonesi P, Scaccabarozzi L, Giuffra E, Castiglioni B: **Differentially expressed genes associated with Staphylococcus aureus mastitis in dairy goats.** *Vet Immunol Immunop* 2010, **135**:208-217.
13. Tao WJ, Mallard B: **Differentially expressed genes associated with Staphylococcus aureus mastitis of Canadian Holstein cows.** *Vet Immunol Immunop* 2007, **120**:201-211.
14. Heringstad B, Klemetsdal G, Ruane J: **Selection for mastitis in dairy cattle: a review with focus on the situation of the Nordic countries.** *Livest Prod Sci* 2000, **64**:95-106.
15. Mrode R, Swanson G: **Genetic and statistical properties of somatic cell count and its suitability as an indirect means of reducing the incidence of mastitis in dairy cattle.** *Anim Breed Abstr* 1996, **64**:847-857.
16. Rupp R, Boichard D: **Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle.** *Vet Res* 2003, **34**:671-688.
17. Shook GE: **Selection for disease resistance.** *J Dairy Sci* 1989, **72**:1349-1362.
18. Detilleux JC: **Genetic factors affecting susceptibility of dairy cows to udder pathogens.** *Vet Immunol Immunop* 2002, **88**:103-110.
19. Ogorevc J, Kunej T, Razpet A, Dovc P: **Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis.** *Anim Genet* 2009, **40**:832-851.
20. Sugimoto M, Fujikawa A, Womack JE, Sugimoto Y: **Evidence that bovine forebrain embryonic zinc finger-like gene influences immune response associated with mastitis resistance.** *P Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:6454-6459.
21. Rupp R, Boichard D, Barbat A, Astruc JM, Lagriffoul G, Barillet F: **Selection for mastitis resistance in french dairy sheep.** *7th world congress on genetics applied to livestock production; Montpellier* 2002, 119-122.
22. Rupp R, Bergonier D, Dion S, Hygonenq MC, Aurel MR, Robert-Granié C, Foucras G: **Response to somatic cell count-based selection for mastitis resistance in a divergent selection experiment sheep.** *J Dairy Sci* 2009, **92**:1203-1219.
23. Sarikaya H, Schlamberger G, Meyer HHD, Bruckmaier RM: **Leukocyte populations and mRNA expression of inflammatory factors in quarter milk fractions at different somatic cell score levels in dairy cows.** *J Dairy Sci* 2006, **89**:2479-2486.
24. Riollet C, Rainard P, Poutrel B: **Cell Subpopulations and Cytokine Expression in Cow Milk in Response to Chronic Staphylococcus aureus Infection.** *J Dairy Sci* 2001, **84**:1077-1084.
25. Nilsdotter-Augustinsson A, Wilsson A, Larsson J, Stendahl O, Ohman L, Lundqvist-Gustafsson H: **Staphylococcus aureus, but not Staphylococcus epidermidis, modulates the oxidative response and induces apoptosis in human neutrophils.** *Apmis* 2004, **112**:109-118.
26. Piepers S, Opsomer G, Meyer E, Derneyere K, Barkema HW, de Kruif A, De Vliegher S: **Heifer and quarter characteristics associated with periparturient blood and milk neutrophil apoptosis in healthy heifers and in heifers with subclinical mastitis.** *J Dairy Sci* 2009, **92**:4330-4339.
27. Takeuchi F, Watanabe S, Baba T, Yuzawa H, Ito T, Morimoto Y, Kuroda M, Cui L, Takahashi M, Ankai A, *et al*: **Whole-genome sequencing of Staphylococcus haemolyticus uncovers the extreme plasticity of its**

genome and the evolution of human-colonizing Staphylococcal species. *J Bacteriol* 2005, **187**:7292-7308.
28. Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD: **IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking.** *Journal of Immunology* 2002, **168**:3195-3204.
29. Holland DB, Bojar RA, Farrar MD, Holland KT: **Differential innate immune responses of a living skin equivalent model colonized by Staphylococcus epidermidis or Staphylococcus aureus.** *Fems Microbiology Letters* 2009, **290**:149-155.
30. Foster TJ: **Immune evasion by Staphylococci.** *Nat Rev Microbiol* 2005, **3**:948-958.
31. Griesbeck-Zilch B, Osman M, Kuhn C, Schwerin M, Bruckmaier RH, Pfaffl MW, Hammerle-Fickinger A, Meyer HHD, Wellnitz O: **Analysis of key molecules of the innate immune system in mammary epithelial cells isolated from marker-assisted and conventionally selected cattle.** *J Dairy Sci* 2009, **92**:4621-4633.
32. Grönlund U, Hultén C, Eckersall PD, Hogarth C, Persson Waller K: **Haptoglobin and serum amyloid A in milk and serum during acute and chronic experimentally induced Staphylococcus aureus mastitis.** *J Dairy Res* 2003, **70**:379-386.
33. Uhlar CM, Whitehead AS: **Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant.** *Eur J Biochem* 1999, **265**:501-523.
34. Lokuta MA, Nuzzi PA, Huttenlocher A: **Calpain regulates neutrophil chemotaxis.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:4006-4011.
35. Ellies LG, Sperandio M, Underhill GH, Yousif J, Smith M, Priatel JJ, Kansas GS, Ley K, Marth JD: **Sialyltransferase specificity in selectin ligand formation.** *Blood* 2002, **100**:3618-3625.
36. Duperray A, Mantovani A, Introna M, Dejana E: **Endothelial-cell regulation of leukocyte infiltration inflammatory tissues.** *Mediat Inflamm* 1995, **4**:322-330.
37. Stuart LM, Deng J, Silver JM, Takahashi K, Tseng AA, Hennessy EJ, Ezekowitz RAB, Moore KJ: **Response to Staphylococcus aureus requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain.** *J Cell Biol* 2005, **170**:477-485.
38. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S: **Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-Negative and Gram-Positive bacterial cell wall components.** *Immunity* 1999, **11**:443-451.
39. Baranova IN, Kurlander R, Bocharov AV, Vishnyakova TG, Chen Z, Remaley AT, Csako G, Patterson AP, Eggerman TL: **Role of human CD36 in bacterial recognition, phagocytosis, and pathogen-induced JNK-mediated signaling.** *J Immunol* 2008, **181**:7147-7156.
40. Stephensen CB: **Vitamin A, infection, and immune function.** *Annu Rev Nutr* 2001, **21**:167-192.
41. Duriancik DM, Lackey DE, Hoag KA: **Vitamin A as a regulator of antigen presenting cells.** *J Nutr* 2010, **140**:1395-1399.
42. Chew BP, Luedecke LO, Holpuch DM: **Effect of dietary vitamin A on resistance to experimental Staphylococcus mastitis in mice.** *J Dairy Sci* 1984, **67**:2566-2570.
43. Murphy KA, Quadro L, White LA: **The intersection between the aryl hydrocarbon receptor (AHR)- and retinoic acid-signaling pathways.** *Vitamin A* 2007, **75**:33-67.
44. De Souza VR, Cabrera WK, Galvan A, Ribeiro OG, De Franco M, Vorraro F, Starobinas N, Massa S, Dragani TA, Ibañez OM: **Aryl hydrocarbon receptor polymorphism modulates DMBA-induced inflammation and carcinogenesis in phenotypically selected mice.** *Int J Cancer* 2009, **124**:1478-1482.
45. Schwerin M, Czernek-Schafer D, Goldammer T, Kata S, Womack J, Pareek R, Pareek C, Walawski K, Brunner R: **Application of disease-associated differentially expressed genes - Mining for functional candidate genes for mastitis resistance in cattle.** *Genet Sel Evol* 2003, **35**:S19-S34.
46. Mueller A, Schafer BW, Ferrari S, Weibel M, Makek M, Höchli M, Heizmann CW: **The calcium-binding protein S100A2 interacts with p53 and modulates its transcriptional activity.** *J Biol Chem* 2005, **280**:29186-29193.
47. Das M, Jiang F, Sluss HK, Zhang C, Shokat KM, Flavell RA, Davis RJ: **Suppression of p53-dependent senescence by the JNK signal transduction pathway.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:15759-15764.
48. Tang X, Molina M, Amar S: **p53 short peptide (p53pep164) regulates lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alfa factor/cytokine expression.** *Cancer Res* 2007, **67**:1308-1316.
49. Dave B, Eason RR, Geng Y, Su Y, Badger TM, Simmen RCM: **Tp53-associated growth arrest and DNA damage repair gene expression is attenuated in mammary epithelial cells of rats fed whey proteins.** *J Nutr* 2006, **136**:1156-1160.
50. Huang WC, Ju TK, Hung MC, Chen CC: **Phosphorylation of CBP by IKKalpha promotes cell growth by switching the binding preference of CBP from p53 to NFkB.** *Mol Cell* 2007, **26**:75-87.
51. Sampaziotis F, Kokotas S, Gorgoulis VG: **P53 possibly upregulates the expression of CD58 (LFA-3) and CD59 (MIRL).** *Med Hypotheses* 2002, **58**:136-140.
52. Keeshan K, Santilli G, Corradini F, Perrotti D, Calabretta B: **Transcription activation function of C/EBP alpha is required for induction of granulocytic differentiation.** *Blood* 2003, **102**:1267-1275.
53. Kastner P, Lawrence HJ, Waltzinger C, Ghyselinck NB, Chambon P, Chan S: **Positive and negative regulation of granulopoiesis by endogenous RAR alpha.** *Blood* 2001, **97**:1314-1320.
54. Labrecque J, Allan D, Chambon P, Iscove NN, Lohnes D, Hoang T: **Impaired granulocytic differentiation in vitro in hematopoietic cells lacking retinoic acid receptors alpha 1 and gamma.** *Blood* 1998, **92**:607-615.
55. Collins SJ, Ulmer J, Purton LE, Darlington G: **Multipotent hematopoietic cell lines derived from C/EBP-alpha-/- knockout mice display granulocyte macrophage-colony-stimulating factor, granulocyte-colony-stimulating factor, and retinoic acid-induced granulocytic differentiation.** *Blood* 2001, **98**:2382-2388.
56. Cheng IKC, Ching AKK, Chan TC, Chan AWH, Wong CK, Choy KW, Kwan M, Lai PBS, Wong N: **Reduced CRYL1 expression in hepatocellular carcinoma confers cell growth advantages and correlates with adverse patient prognosis.** *J Pathol* 2010, **220**:348-360.
57. Galcheva-Gargova Z, Gangwani L, Konstantinov KN, Mikrut M, Theroux SJ, Enoch T, Davis RJ: **The cytoplasmic zinc finger protein ZPR1 accumulates in the nucleolus of proliferating cells.** *Mol Biol Cell* 1998, **9**:2963-2971.
58. Kobayashi SD, Braughton KR, Whitney AR, Voyich JM, Schwan TG, Musser JM, DeLeo FR: **Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:10948-10953.
59. Barba-Barajas M, Hernandez-Flores G, Lerma-Diaz JM, Ortiz-Lazareno PC, Dominguez-Rodriguez JR, Barba-Barajas L, de Celis R, Jave-Suarez LF, Aguilar-Lemarroy AC, Guevara-Barraza MG, Bravo-Cuellar A: **Gossypol induced apoptosis of polymorphonuclear leukocytes and monocytes: Involvement of mitochondrial pathway and reactive oxygen species.** *Immunopharm Immunot* 2009, **31**:320-330.
60. Ali AKA, Shook GE: **An optimum transformation for somatic-cell concentration in milk.** *Journal of Dairy Science* 1980, **63**:487-490.
61. Casel P, Moreews F, Lagarrigue S, Klopp C: **sigReannot: an oligo-set re-annotation pipeline based on similarities with the Ensembl transcripts and Unigene clusters.** *BMC Proc* 2009, **3**:S3.
62. Bossers K, Ylstra B, Brakenhoff RH, Smeets SJ, Verhaagen J, van de Wiel MA: **Intensity-based analysis of dual-color gene expression data as an alternative to ratio-based analysis to enhance reproducibility.** *Bmc Genomics* 2010, **11**.
63. Pawitan Y, Michiels S, Koscielny S, Gusnanto A, Ploner A: **False discovery rate, sensitivity and sample size for microarray studies.** *Bioinformatics* 2005, **21**:3017-3024.
64. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA: **Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.** *Nature Protocols* 2009, **4**:44-57.
65. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA: **Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists.** *Nucleic Acids Research* 2009, **37**:1-13.
66. Rozen S, Skaletsky H: **Primer3 on the www for general users and for biologist programmers.** *Method Mol Biol* 2000, **132**:365-386.
67. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F: **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biol* 2002, **3**:research0034.0031-research0034.0011.

doi:10.1186/1471-2164-12-208
Cite this article as: Bonnefont *et al.*: Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics* 2011 **12**:208.

4 Discussion

Cette expérience réalisée à partir de cellules prélevées dans le lait de brebis de la lignée résistante et de brebis de la lignée sensible inoculées successivement avec deux staphylocoques différents (S. epidermidis et S. aureus) a permis d'apporter quelques éléments de réponse à l'hypothèse de départ. Le transcriptome des cellules du lait chez les brebis de la lignée résistante est différent de celui des cellules des brebis de la lignée sensible. Si on corrèle cette observation avec la capacité des brebis à éliminer les bactéries plus efficacement, il est donc probable que cet ensemble de gènes permette d'expliquer cette propriété. Cette question avait émergé à la suite du constat que les CCS après infection étaient similaires entre les deux groupes d'animaux, mais que les titres bactériens étaient plus faibles chez les brebis de la lignée résistante que chez les brebis de la lignée sensible.

Un premier élément est la capacité probablement différente des cellules et des neutrophiles à détecter la présence des bactéries par l'intermédiaire du récepteur TLR2 ; le gène codant pour ce récepteur est plus exprimé dans les CSL des brebis de la lignée résistante que dans celles des brebis de la lignée sensible. TLR2 a la capacité de reconnaître l'acide lipotéicoïque (Takeuchi et al. 1999), les peptidoglycanes et les lipoprotéines qui sont les principaux composés de la paroi des bactéries Gram-positives (Wicken et Knox 1970). Il a été montré que l'activation de la voie TLR2 ou TLR4 déclenche une réponse immunitaire par l'intermédiaire d'une cascade de réactions passant soit par la voie NFκB, soit par celle des kinases MAPK/ERK (Arbibe et al. 2000; Salojin et al. 2006; Yokoyama et al. 2006; Bohnenkamp et al. 2007; Sahay et al. 2009). La voie MAP kinase contrôle la libération des cytokines en réponse aux PAMP (Salojin et al. 2006; Kontoyiannis et al. 1999; Iwasaki et Medzhitov 2004; Hoebe et al. 2004).

La comparaison du transcriptome des CSL des brebis de la lignée résistante et des brebis de la lignée sensible a mis en évidence une surexpression de quelques gènes reliés à la voie des MAPK (*eif4ebp1* et *itga5*), mais n'a pas permis de montrer une différence d'expression des principales cytokines impliquées dans le recrutement des neutrophiles et la réponse inflammatoire (TNFα, IL1β, IL6, IL8 et IFNγ).

Cependant sept gènes codant pour des protéines (ALCAM, CCL5, ITGA5, SELP, SELPG, ST3GAL4 et CAPN3) impliquées dans le recrutement des neutrophiles et leur adhésion aux cellules endothéliales ont un niveau d'expression supérieur dans les CSL des brebis de la lignée résistante par rapport aux CSL des brebis de la lignée sensible. Les six premiers gènes favorisent l'adhésion des neutrophiles aux cellules épithéliales et ainsi contribuent à la diapédèse. Au contraire il a été montré que l'inhibition de CAPN3 promeut le chimiotactisme et la diapédèse en condition naturelle, mais que sous l'effet d'un gradient d'IL-8 ou du peptide fmlp, c'est le contraire, la moindre expression de CAPN diminue la diapédèse (Lokuta et al. 2003). Le recrutement des neutrophiles et donc la diapédèse semblent plus activés chez les brebis de la lignée résistante que chez les brebis de la lignée sensible. Or la mesure des concentrations de cellules somatiques dans le lait n'a révélé aucune différence entre les deux groupes de brebis. Cela peut-être lié i) aux valeurs obtenues très élevées qui pour des raisons analytiques, sont affectées d'un grand facteur de variation de la mesure et donc d'erreur ; ii) à la grande variabilité au sein même de chaque lignée après infection qui ne permet pas d'établir une différence entre les lignées avec les effectifs testés. Les neutrophiles n'ont plus la capacité de se diviser, les dénombrements des cellules du lait sont donc le résultat du nombre de cellules présentes, c'est-à-dire de cellules dont le noyau est intact puisque leur dénombrement repose sur un comptage nucléaire. Ainsi la diapédèse semble être

plutôt favorisée chez les brebis de la lignée résistante, même si ce résultat ne se traduit pas par une augmentation mesurée des CCS dans le lait des brebis de la lignée résistante.

Trois hypothèses peuvent être formulées à ce stade :

H1 : L'adhésion des neutrophiles circulant aux cellules endothéliales est favorisée chez les brebis de la lignée résistante par rapport aux brebis de la lignée sensible, mais il existe un blocage en aval, par exemple lors de la traversée de la couche endothéliale.

H2 : Le nombre de neutrophiles sanguins est supérieur chez les brebis de la lignée sensible, ce qui compense la plus forte activation des gènes impliqués dans le recrutement de neutrophiles chez les brebis de la lignée résistante.

H3 : Un plus grand nombre de neutrophiles est recruté dans la glande mammaire des brebis de la lignée résistante, mais l'arrivée massive de neutrophiles est compensée par une apoptose plus élevée dans ce groupe, avec pour conséquence des CCS équivalents dans le lait des brebis de la lignée résistante et de la lignée sensible.

Il est difficile de réfuter ou d'approuver définitivement l'hypothèse H1, même si elle semble peu probable car les neutrophiles qui adhèrent aux cellules endothéliales devraient alors s'accumuler.

Concernant l'hypothèse 2, des échantillons de sang avaient été prélevés au cours de l'infection expérimentale pour un dénombrement de cellules sanguines. L'évolution des concentrations de neutrophiles sanguins chez les deux lignées de brebis est présentée dans la Figure 11. L'analyse statistique de ces données a montré que les concentrations de neutrophiles sanguins sont supérieures chez les brebis de la lignée résistante que chez les brebis de la lignée sensible sur la période 12-60 heures post infection ($moy_{résistant}$ = 5.5 10e9 cellules/L vs $moy_{sensible}$ = 3,7). Ainsi l'hypothèse H2 peut être écartée.

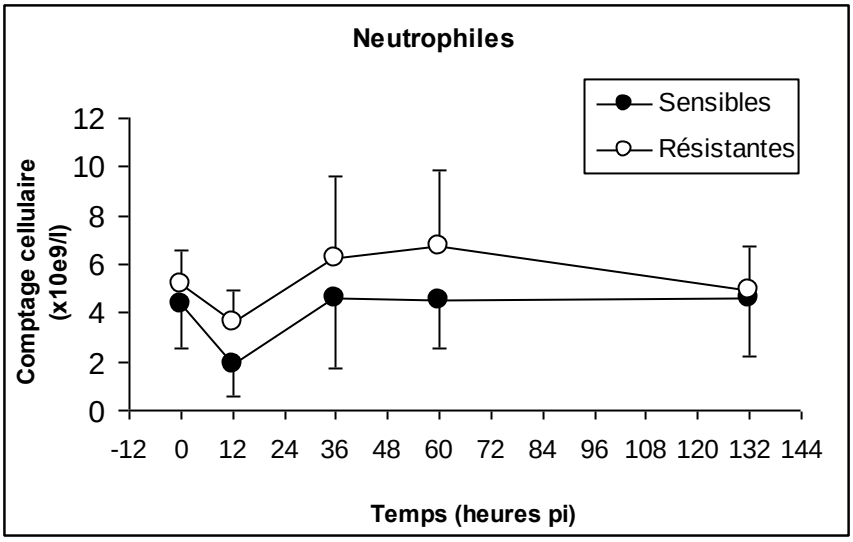


Figure 11 : Dénombrement des neutrophiles sanguins dans les six jours après l'inoculation intra-mammaire de *S. aureus*

Les analyses transcriptomiques ont montré que l'expression de certains gènes impliqués dans la granulopoièse (*rara* et *cebpa*) était plus élevée dans les CSL de brebis de la lignée résistante que dans celles des brebis de la lignée sensible. La différenciation des neutrophiles dure de 10 à 14 jours dans la moelle osseuse et une fois mâtures, les neutrophiles

peuvent y être stockés quelques jours (Bainton et al. 1971). Puis ils quittent le compartiment hématopoïétique et circulent brièvement dans le sang (Carlson et Kaneko 1973). Lors d'une infection, ils sortent du compartiment vasculaire par diapédèse entre les cellules endothéliales pour se diriger vers le site de l'infection. Le fait que certains gènes de la granulopoièse soient plus exprimés dans les CSL des brebis de la lignée résistante signifie peut-être que des cellules moins matures ont été recrutées dans ce groupe suggérant une production médullaire et un recrutement local plus intense chez les brebis de la lignée résistante. C'est également ce que suggèrent les données hématologiques, où la neutropénie relative est moins marquée chez les brebis de la lignée résistante. Les réserves de neutrophiles ou la granulopoïèse ont peut-être été plus grandes d'où un recrutement sanguin plus élevé de neutrophiles dans cette lignée. En parallèle, des gènes impliqués dans la régulation de la mort cellulaire (*txnip, hmgb, tp53, tlr2, hspa1a, cited2, akt1, prlr, smppd1, ctsb* et *perp*) sont plus exprimés dans les CSL des brebis de la lignée résistante. Ainsi, l'hypothèse H3 peut être acceptée si l'on considère que le renouvellement des cellules est plus élevé dans la glande mammaire des brebis de la lignée résistante. Là encore, cette hypothèse est également cohérente avec la concentration de neutrophiles sanguins plus élevée chez les brebis de la lignée résistante.

Les résultats des analyses d'expression génique n'ont donné aucune information sur d'éventuelles différences sur les activités phagocytaires des neutrophiles, qui sont des processus importants pour l'élimination des agents pathogènes.

A l'inverse, trois gènes qui codent pour des facteurs de transcription (RARα et TP53 et AHR), c'est-à-dire des protéines qui ont la capacité de réguler l'expression d'un grand nombre d'autres gènes, sont différemment exprimés chez les brebis de la lignée résistante et de la lignée sensible. RARα est le récepteur des composés dérivés de la vitamine A ; il a une influence sur l'immunité innée en favorisant les activités des neutrophiles, des macrophages et des cellules NK (Stephensen 2001). TP53 est surtout connu pour son implication dans le cancer, mais il a été montré que ce gène était plus exprimé dans les quartiers infectés chez la vache que dans les quartiers sains (Schwerin et al. 2003). AHR joue un rôle dans le contrôle de la réponse inflammatoire (de Souza et al. 2009). Ces facteurs de transcription, du fait de leur rôle central dans la régulation de plusieurs gènes différemment exprimés entre les deux lignées de brebis, pourraient contribuer de façon prépondérante aux différences observées.

En résumé, à partir de ces données, on ne peut pas conclure à des différences de bactéricidie entre les cellules des brebis de la lignée résistante et les brebis de la lignée sensible. L'activité transcriptionnelle étant faible, et l'activité de bactéricidie peut dépendante des protéines exprimées de novo, ce résultat n'est pas très surprenant. Par contre, la capacité de détection des bactéries *via* TLR2 et le phénomène de recrutement/mort cellulaire peuvent expliquer, en partie tout du moins, les différences de réponse entre les deux lignées à l'infection par les staphylocoques.

PARTIE 2 : ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DES CELLULES DENDRITIQUES DERIVEES DE LA MOELLE OSSEUSE CHEZ DES BREBIS DE LA LIGNEE RESISTANTE ET DE LA LIGNEE SENSIBLE AUX MAMMITES APRES STIMULATION *IN VITRO* PAR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

1 Contexte et objectifs

L'étude de la comparaison des cellules somatiques du lait après infection a permis d'apporter des informations sur les différences exprimées par les cellules du lait, dont les neutrophiles, dans les deux lignées divergentes de brebis. D'autres types cellulaires, qui ne sont pas accessibles par la collecte du lait après infection, peuvent aussi participer aux différences de sensibilité aux mammites. Aussi, en parallèle de la première analyse, nous avons choisi d'étudier les cellules dendritiques car elles ont un rôle important, au carrefour de l'immunité innée et de l'immunité adaptative (Banchereau et al. 2000; Huang et al. 2001).

Les cellules dendritiques ont été découvertes dans les organes lymphoïdes (Steinman et Cohn 1973), mais elles sont également localisées dans les tissus connectifs de tous les organes, sauf le cerveau (Hart et Fabre 1981) et précisément dans les interstices entre les cellules épithéliales mammaires (Joshi et al. 1985). Les cellules dendritiques présentent des antigènes qui peuvent déclencher une réponse immunitaire adaptative (Steinman et al. 1979). En particulier, les cellules dendritiques situées en périphérie de la glande mammaire expriment les molécules du CMH à leur surface (Joshi et al. 1985). La présence de certains marqueurs différencie les cellules dendritiques des macrophages qui les expriment peu ou pas du tout, permettant ainsi de les différencier. Les cellules dendritiques ont la capacité bien connue de stimuler l'activation des lymphocytes T (Steinman et Witmer 1978), mais aussi les neutrophiles (Bohannon et al. 2010) ; et en retour les neutrophiles peuvent modifier le recrutement ou la maturation des cellules dendritiques (Charmoy et al. 2010; Lande et al. 2011). Ainsi il existe un lien étroit entre neutrophiles et cellules dendritiques.

Récemment l'équipe de Schwerin a utilisé un modèle animal comparable au notre pour étudier la résistance aux mammites ; il s'agit de vaches sélectionnées sur les allèles d'un QTL associé au SCS et présent sur le chromosome BTA18 (Kuhn et al. 2008). Cette équipe a montré qu'après stimulation de cultures primaires de cellules épithéliales mammaires, la voie de « maturation des cellules dendritiques » était plus activée chez les vaches résistantes aux mammites que chez les sensibles (Brand et al. 2011). Les résultats de cette étude sont un argument supplémentaire en faveur de l'étude des cellules dendritiques dans les lignées divergentes de brebis.

De plus, il a été montré que les cellules dendritiques de souris ayant une meilleure capacité à éliminer *S. aureus* secrétaient plus de CXCL2 et favorisaient la réponse Th2, par rapport à celles de souris sensibles à l'infection et qui favorisaient plutôt la voie dite Th1 (Nippe et al. 2011). La réponse de type 1 se traduit par une sécrétion d'IL12 par les CD et un effet pro-inflammatoire plus marqué, tandis que la réponse de type 2 se traduit par une sécrétion d'IL10, qui induit la formation de cellules T régulatrices, et régule la réponse

inflammatoire (Banchereau et al. 2000; Steinman et al. 2003). Ainsi les CD peuvent avoir une action déterminante sur le devenir de l'infection.

Il est possible de collecter *in vivo* des cellules dendritiques directement à partir du tissu mammaire ou par canulation des vaisseaux lymphatiques, mais les difficultés inhérentes aux techniques pour extraire ces cellules nous ont conduits à utiliser un modèle *in vitro* qui avait été développé au laboratoire (Foulon et Foucras 2008). Celui-ci permet de générer de nombreuses cellules dendritiques à partir de cellules de la moelle osseuse stimulées avec la cytokine GM-CSF.

Nous avons donc fait l'hypothèse que les **cellules dendritiques des brebis de la lignée résistante, en relation avec leur capacité de détection des agents pathogènes et de transmission du signal, notamment via la voie TLR2 ou du profil des cytokines sécrétées, étaient différentes de celles des brebis de la lignée sensible.** Les travaux publiés dans ce deuxième article ont pour objectif d'évaluer cette hypothèse au niveau transcriptionnel.

2 Résumé

Parmi les brebis qui avaient fait l'objet d'une infection expérimentale, quatre brebis de la lignée résistante et quatre brebis de la lignée sensible ont été choisies pour l'étude des cellules dendritiques (CD). Sept sur huit de ces brebis faisaient également partie de l'étude précédente (Article 1). Des cellules souches de la moelle osseuse ont été différenciées *in vitro* en CD (Foulon et Foucras 2008). La pureté des cellules après 6 à 7 jours de culture était de 90%. Ces cellules ont été stimulées *in vitro* avec des bactéries *S. aureus* inactivées par la chaleur (*heat killed S. aureus, HK-Sa*). Le contact des CD avec HK-Sa provoque une activation des cellules tout en limitant les effets toxiques qui seraient produits par une bactérie vivante, ce qui permet de limiter les phénomènes d'apoptose et d'obtenir des ARNm de bonne qualité pour les analyses transcriptomiques.

Des CD ont été prélevées avant la stimulation par *HK-Sa* (T0) et après 3 ou 8 heures de stimulation (respectivement, T3 et T8). Tout d'abord, la réponse des CD a été étudiée au cours du temps. L'analyse de variance a permis d'identifier 3058 gènes dont l'expression variait significativement au cours du temps (p-value corrigée par la procédure de Benjamini-Hochberg < 0.01) et 419 gènes en ne conservant que les gènes dont la variation d'expression était supérieure à 2. Parmi ces 419 gènes, 83% sont activés au cours du temps. Plusieurs gènes sont impliqués dans la réponse pro-inflammatoire (*il1α, il1β, il6, tnfα* et *nkκb*), trois sont des marqueurs de la maturation des CD (*cd40, cd83 et cdh1*), trois sont des *colony stimulating factors* (*csf1, csf2* et *csf3*) et sont impliqués dans la différenciation des granulocytes et des macrophages ; en outre, quatre gènes codent pour des molécules à domaines CXC ou CC (*cxcl10, cxcl16*) et leurs récepteurs (*cxcr5* et *ccr7*). Parmi les 17 % de gènes réprimés au cours du temps, on peut citer *adora3, ccr3, cfos,* et *sulf2*. Les gènes qui évoluent au cours du temps sont principalement impliqués dans les voies de signalisation des interleukines (IL10 et d'IL12), du TNFR1 et 2 et des récepteurs de reconnaissance de bactéries, dans la maturation des cellules dendritiques et la différenciation des cellules T et dans les communications cellulaires entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

Dans un deuxième temps, les répertoires des gènes exprimés par les CD des hôtes résistants et sensibles ont été comparés. Un groupe de 204 gènes différemment exprimés entre les CD des deux groupes de brebis ont été identifiés (p-value corrigée par la procédure de Benjamini-Hochberg < 0.01 et FC > 1.5). Parmi les 204 gènes, 52% sont plus exprimés dans les CD des brebis de la lignée résistante que dans les CD des brebis de la lignée sensible, dont de nombreux gènes du système immunitaire : de la voie classique du complément (*c1qa, c1qb*

et *c1qc*) et de sa régulation (*cd59* qui était plus exprimé chez les brebis de la lignée résistante après 8h de stimulation), des sous-unités du CMH de classe 1, des gènes de la famille TRAF (*traf4, traf7* et *traf3ip2*), de la famille des motifs tri-partites (*trim2, trim39* et *trim45*) ou de la famille des métallo-protéinases (*mmp9* et *mmp12*). Au contraire, des gènes impliqués dans la migration trans-endothéliale des leucocytes (*btk, itgam, vav1, actn1, msn, f11r* et *cldn1*) ont une expression plus élevée dans les CD des brebis de la lignée sensible.

L'étude du transcriptome entre les deux lignées de brebis a aussi été réalisée à chaque temps de stimulation (T0, T3 ou T8). Le nombre de gènes différentiels entre les deux lignées était supérieur pour les échantillons non stimulés (T0) que pour les échantillons stimulés par *S. aureus* (153 gènes différentiels entre les lignées à T0, 103 à T3 et 108 à T8) avec une proportion variable de gènes surexprimés dans les CD des brebis de la lignée résistante (47% à T0, 43% à T3 et 57% à T8). Les principales voies qui différencient les CD entre les lignées sont la voie de signalisation de l'IL17 et des récepteurs des cellules B à T0, la voie de signalisation des intégrines à T0 et T3 et la voie de signalisation du système du complément et de AHR à T8.

3 Article 2

Gene Expression Profiling of Dendritic Cells Reveals Important Mechanisms Associated with Predisposition to *Staphylococcus* Infections

Toufeer M, **Bonnefont CMD**, Foulon E, Caubet C, Tasca C, Aurel MR, Robert-Granié C, Rupp R, Foucras G

Plos One, 2011, vol 6, issue 8, e22147

DOI 10.1371/journal.pone.0022147

URL : http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022147

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

Gene Expression Profiling of Dendritic Cells Reveals Important Mechanisms Associated with Predisposition to *Staphylococcus* Infections

Mehdi Toufeer[1,2], Cécile M. D. Bonnefont[1,2,3], Eliane Foulon[1,2], Cécile Caubet[1,2], Christian Tasca[1,2], Marie-Rose Aurel[4], Christèle Robert-Granié[3], Rachel Rupp[3], Gilles Foucras[1,2]*

1 Université de Toulouse, INP, ENVT; UMR 1225, IHAP, Toulouse, France, **2** INRA, UMR1225, IHAP, Toulouse, France, **3** INRA, UR631, SAGA, Castanet-Tolosan, France, **4** INRA, UE321, Roquefort, France

Abstract

Background: *Staphylococcus aureus* is a major pathogen of humans and animals and emerging antibiotic-resistant strains have further increased the concern of this health issue. Host genetics influence susceptibility to *S. aureus* infections, and the genes determining the outcome of infections should be identified to find alternative therapies to treatment with antibiotics. Here, we used outbred animals from a divergent selection based on susceptibility towards *Staphylococcus* infection to explore host immunogenetics.

Methodology/Principal Findings: We investigated how dendritic cells respond to heat-inactivated *S. aureus* and whether dendritic cells from animals showing different degrees of susceptibility had distinct gene expression profiles. We measured gene expression levels of *in vitro S. aureus*-stimulated bone marrow-derived dendritic cells at three different time points (0, 3 and 8 hrs) by using 15 k ovine Agilent microarrays. Furthermore, differential expression of a selected number of genes was confirmed by RT-qPCR. Gene signatures of stimulated DCs were obtained and showed that genes involved in the inflammatory process and T helper cell polarization were highly up-regulated upon stimulation. Moreover, a set of 204 genes were statistically differentially expressed between susceptible and resistant animals, and grouped them according to their predisposition to staphylococcal infection. Interestingly, over-expression of the *C1q* and *Ido1* genes was observed in the resistant line and suggested a role of classical pathway of complement and early regulation of inflammation pathways, respectively. On the contrary, over expression of genes involved in the IL1R pathway was observed in susceptible animals. Furthermore, the leucocyte extravasation pathway was also found to be dominant in the susceptible line.

Conclusion/Significance: We successfully obtained *Staphylococcus aureus* associated gene expression of ovine BM-DC in an 8-hour kinetics experiment. The distinct transcriptional profiles of dendritic cells obtained from resistant and susceptible animals may explain susceptibility towards *S. aureus* infections in a broader context.

Citation: Toufeer M, Bonnefont CMD, Foulon E, Caubet C, Tasca C, et al. (2011) Gene Expression Profiling of Dendritic Cells Reveals Important Mechanisms Associated with Predisposition to *Staphylococcus* Infections. PLoS ONE 6(8): e22147. doi:10.1371/journal.pone.0022147

Editor: T. Mark Doherty, Statens Serum Institute, Denmark

Received October 6, 2010; **Accepted** June 19, 2011; **Published** August 12, 2011

Copyright: © 2011 Toufeer et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Studies were supported by Action Concertée Incitative (ACI) Microbiologie 2003, ANR Génanimal 2005 Genoma II, APIS-GENE, and European Network of Excellence(EADGENE). MT was supported by Higher Education Commission, Pakistan. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: g.foucras@envt.fr

Introduction

Staphylococcus aureus is a common bacterium causing diseases in a wide range of host species [1–4]. In contrast to its commensal status, *S. aureus* is also a very frequent pathogen causing infections of the skin and soft tissues, and sepsis. In humans and animals, it is a problem further compounded by the recent appearance of strains with broad antibiotic resistance, including methicillin-resistant *S. aureus* strains (MRSA) [5]. The duality of *S. aureus* interactions with the hosts, from apparently innocuous colonization to highly pathogenic invasion, emphasizes the need to better understand the host response to *Staphylococci*. Despite the huge health issues related to *S. aureus*, it is not yet known which immune mechanisms control the susceptibility of an organism to this kind of bacteria.

To date, most efforts have been focused on advancing knowledge on the pathogen and its remarkable repertoire of virulence factors. Less work has been carried out on host predisposition to *S. aureus* infections [6–8]. In humans, few studies have focused on the comparison of the transcriptional signatures of peripheral blood mononuclear cells from patients with *S. aureus* infections with those of healthy individuals [9]. Nevertheless, *S. aureus* infection has been examined in mouse strains that show varying degrees of resistance to infection, and innate immune mechanisms were thought to be linked with genetic control [10]. Several studies have been conducted on zebrafish, and phagocyte-dependent resistance was associated with a favorable outcome. Moreover, *Caenorhabditis elegans* and drosophila have also been exploited as invertebrate models to decipher the mechanisms of response to *S. aureus* [11–13]. The necessarily retrospective design

of studies in humans means that it is particularly difficult to use them to identify immune mechanisms associated with protection against *S. aureus*. Moreover, in the other interaction models listed above, poor genetic variability limits their usefulness to study the genetic control of immune responsiveness.

Therefore, in the present study we have designed and implemented a new outbred animal model to explore the immune response of mammals to *S. aureus* infections. For this purpose, we used sheep from a divergent selection based on the susceptibility to staphylococcal infections of the mammary gland, a spontaneous and frequent infectious disease in this species [14]. Our initial experiments conducted on this animal resource clearly indicated that the two genetic lines showed a varying degree of natural resistance towards mammary infections and responded differently to staphylococcal infections [14]. The initial characterization of these animals supported the hypothesis that the immune outcome of such infections was different in the two lines, and therefore that this trait is probably under genetic control. Previous studies also suggest the involvement of genetic factors in the response to mammary infections [15].

It is generally considered that the mechanisms underlying resistance or susceptibility traits, which by essence are multifactorial, to staphylococcal infections are complex and therefore difficult to understand. A comprehensive study of the trait in *in vivo* infections seemed unwise at this stage due to the complexity and dynamic aspects of interactions and mediation in immune cells. Therefore, as a first step to identify what underlies the differences of predisposition to staphylococcal infection, we conducted an *in vitro* study of the interactions between dendritic cells (DCs) and *Staphylococcus*. DCs were our first choice due to their corner stone position between innate and adaptive immune responses [16]. Moreover, they share a large gene repertoire in common with other cell types such as macrophages, due to their myeloid precursor origin [17]. Previous studies have shown that DCs contribute to the various degrees of susceptibility towards several bacterial and parasitic pathogens, and their response on pathogen contact is of highly variable nature [18–21]. Hence, we hypothesized that DCs from animals showing different degrees of susceptibility to staphylococcal infections may have distinct transcriptional profiles upon infection.

Gene expression profiling has recently found applications in diagnosis, prognosis and exploring host-pathogen interactions in infectious diseases [9,22]. Similarly, the identification of gene expression signatures indicative of disease subtypes through microarray technology has improved our understanding of the molecular basis of disease [23]. Moreover, transcriptome analysis has already been successfully applied to DCs, and provided new insights into immune responses [22,24].

Therefore, we used gene expression profiling with an ovine-specific 15 k Agilent microarray to identify transcriptomic differences in ovine DCs from susceptible and resistant animals, in relation to staphylococcal immunity. Here, we show that the comparison of DC gene expression between both animal groups reveals striking differences and provides a basis for possible mechanisms involved in immune protection against *Staphylococci*.

Results

Characterization of ovine bone marrow-derived dendritic cell response to heat-killed *Staphylococcus aureus*

In order to explore the response of dendritic cells from resistant and susceptible animals, we generated bone marrow-derived dendritic cells (BM-DCs) from sheep with known susceptibility according to their line and to results obtained from a previous infectious challenge (data not shown). After 6–7 days of culture, BM-DCs purity (>90%) and phenotype were assessed by flow cytometry. No difference was observed at this stage with available markers (data not shown). BM-DCs were stimulated with a commercial preparation (Pansorbin, Calbiochem) of heat-killed *S. aureus* (*HK-Sa*; 20 µg/ml) for 3 and 8 hrs. Following stimulation of BM-DCs, no differences were observed between the cells from both lines and their activation status as determined by flow cytometry was very similar. Based on data accumulated on DCs biology, the expression of a number of cytokine genes was quantified after 3 and 8 hrs of incubation (Fig. 1A). The transcripts of the pro-inflammatory cytokines *il1a*, *-1b*, *-6* and *tnfα* were considerably up-regulated 3 hrs post-stimulation, and high levels were maintained for all these cytokines after 8 hrs. *Il8* and *il15*, potent recruiters and activators of neutrophil granulocytes and NK cells respectively, were also highly expressed. Among T helper-polarizing cytokines, *il10*, *-12* and *-23*, mRNA expression was up-regulated (Fig. 1D). Interestingly, the transcription of the *il23* coding gene continued to increase as late as 8 hrs post-stimulation as compared to *il10* and *il12*. The expression of several Toll-like receptors (TLRs) was also measured, and a 2-fold increase in the transcription of *tlr2* and *tlr4* was observed, whereas the expression of *tlr6* showed little change and did not change much after stimulation.

Besides validating our *in vitro* assay and cell activation conditions, these data indicate that ovine BM-DCs are highly responsive to *HK-Sa*, since it induced the expression of a set of pro-inflammatory cytokine genes.

Transcriptional analysis of DCs upon *HK-Sa* stimulation through microarray profiling

To further examine DC gene expression upon *HK-Sa* stimulation, all three experimental conditions described above (time points: 0, 3 and 8 hrs) were compared in a dye-swap experimental design.

Firstly, probe levels from the non-stimulated time-point (0 hr) and after stimulation with *HK-Sa* (3 and 8 hrs) were compared. Globally, ANOVA of microarray data revealed that a large number of genes were mobilized after *HK-Sa* stimulation (>3,000, with a corrected Benjamini-Hochberg (BH) false discovery rate p-value inferior to 0.01).

When considering only genes showing at least a 2-fold difference in expression at one of the three conditions (T3 vs T0, T8 vs T0 and T8 vs T3), a total number of 419 genes (Table S1) were found. Unsupervised hierarchical clustering of these genes indicated that they could be grouped into at least 4 subsets based on their mode of expression after stimulation (Fig. 2). Expression changes peaked at 3 hrs post-stimulation as compared to 8 hrs. Moreover, the number of up-regulated genes was higher than the number of down-regulated genes in the kinetics. The expression of most of the genes (n = 176) peaked at the 3-hr time-point and then decreased. The expression of 120 genes was increased at both post-stimulation time-points *i.e* 3 and 8 hrs, whereas 60 genes were down-regulated at these same time-points. The expression of a few genes (n = 63) tended to increase later on at 8 hrs. Fold changes (FC) for the differences in gene expression when comparing the three time-points (T3 vs. T0, T8 vs. T0 and T8 vs. T3) ranged from 9 to −7, 15 to −10 and 4 to −3, respectively. A list of the most differentially up- and down-regulated genes observed in the kinetics experiment is presented in the Table 1.

Globally, stimulation with *HK-Sa* modulated the gene expression of DCs and a number of genes involved in the pro-inflammatory response were over-expressed such as *il1a*, *−1b*, *−6* and *tnfα*, as previously indicated by the pre-microarray analysis by

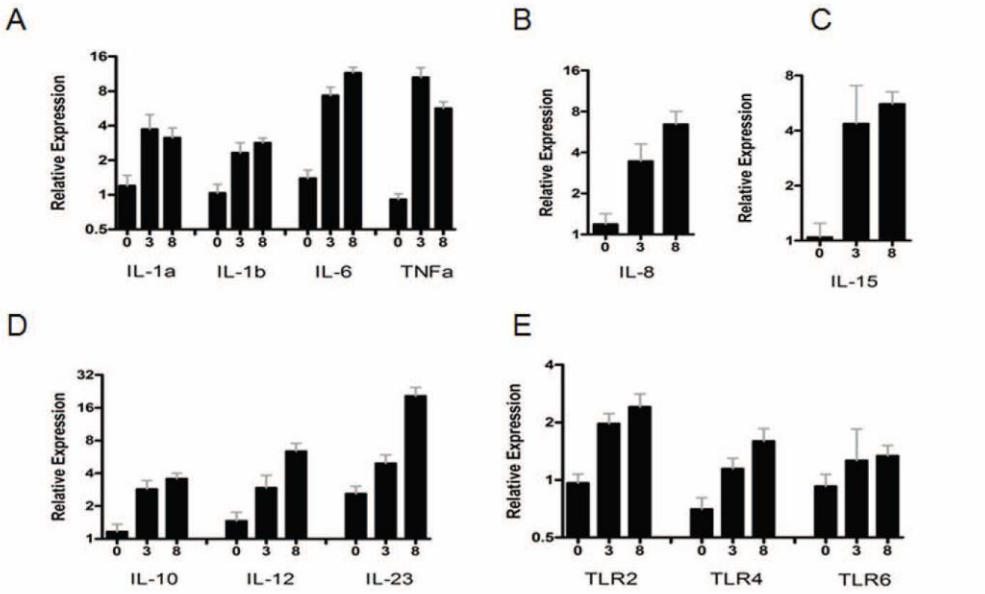


Figure 1. Pre-microarray validation of DC activation by RT-qPCR. Relative expression of mRNAs of different cytokines at three time points (0, 3 and 8 hrs post-stimulation) normalized by common reference genes (*rp19, hprt, tyr* and *gapdh*) by using $2^{-\Delta\Delta}$method. Data was combined from both resistant and susceptible animals in this experiment (A) Pro inflammatory cytokines (*Il1a, −1b, −6* and *tnfa*). (B) Il8 (C) *il15* (D) T helper polarizing cytokines (*il10, −12* and *−23p19*) (E) Toll like receptors (*tlr2, −4* and *−6*).
doi:10.1371/journal.pone.0022147.g001

RT-qPCR. *Nfkb* was highly expressed at 3 hrs and as late as 8 hrs post-stimulation. *Cd40* and *cd83*, important markers of dendritic cell maturation were also up-regulated upon stimulation. Colony stimulating factors (*csf1*, *−2* and *−3*) involved in the production, differentiation and function of granulocytes and macrophages were among the most strongly up-regulated genes after interaction with *HK-Sa*. The expression of a few chemokines (*cxcl10* and *cxcl16*) and chemokine receptors (*cxcr5* and *ccr7*) was also up-regulated. On the other hand, staphylococcal exposure of dendritic cells also negatively modulated the expression of various genes, such as *adora3*, *ccr3*, *cfos*, *cdh1* and *sulf2* which all showed lower expression 3 and 8 hrs post-stimulation.

In order to validate our microarray results, the expression of 18 differentially-expressed genes (FDR $p<0.01$; $FC>2$) was measured using RT-qPCR. Microarray and RT-qPCR results are compared in table 2, which also shows a Pearson coefficient correlation of 0.9 between both methods (except for *il-15* that was found to be hugely up-regulated by RT-qPCR (54 fold) and much less so with the microarray (3.27 fold). Statistical Mann-Whitney tests were conducted on expression data and a minimum significance of $p<0.05$ was observed for all quantified genes.

In conclusion, ovine BM-DCs responded strongly to the stimulus and present a novel transcriptional profile upon stimulation with *S. aureus*. The scale of the gene mobilization observed 3 and 8 hrs post-stimulation revealed that gene reprogramming of dendritic cells occurs after exposure to *HK-Sa*. The gene profiles obtained are mostly associated with pro-inflammatory conditions.

Comparison of transcriptional profiles of DCs from susceptible and resistant animals

Using the same ANOVA, the gene expression between genetic lines was compared. Statistical analysis showed that 204 genes were differentially-expressed between DCs of the two lines (BH 1%, $FC>1.5$) in at least one of the three time points (Table S2). Overall, a $FC>-2$ to 3 in the expression of differentially-expressed genes was observed, with some quite important differences in expression (several genes showed FCs of -7 or +8). Moreover, animals belonging to susceptible and resistant lines could be grouped perfectly on the basis of this differentially-expressed gene list using Pearson-centered unsupervised hierarchical clustering (Fig. 3B). Furthermore, independent analysis using a volcano plot ($p<0.01$; $FC>1.5$) was performed to identify which genes were differentially expressed between the lines at each of the three time points (Table S3). Indeed, 153 genes were found to be differentially-expressed between both lines at T0. Among these differentially-expressed genes at T0, 72 and 81 genes were expressed at a higher level in the resistant and the susceptible line, respectively. Moreover, 103 genes (respectively 44 and 59 genes in resistant and susceptible animals) were modulated at T3, whereas 168 (respectively 95 and 73 in resistant and susceptible lines) genes were found to show different levels of expression at T8. Interestingly, only 13 genes were found in all three lists (Fig. 3A). Although the majority of the genes identified with this statistical method are on the ANOVA list, it provides additional information about differentially-expressed genes at each time point instead of

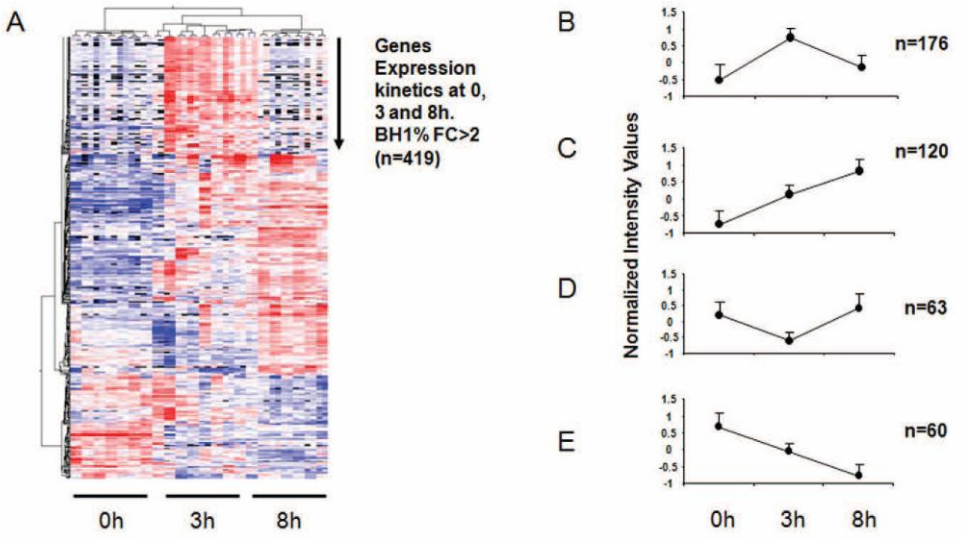


Figure 2. DC gene signature upon *Staphylococcus aureus* interaction at three different time points (0, 3 and 8 hrs). (A) Clustering analysis of differentially expressed genes (BH1%, FC>2, n = 419) at 0, 3 and 8 hrs post stimulation. (B) Rapidly exhausted genes subset (n = 176) (C) Post-stimulation up-regulated genes subset (n = 120) (D) Down-regulated genes at 3 hrs but up-regulated at 8 hrs post-stimulation (n = 63) (E) Post stimulation down-regulated genes (n = 60).
doi:10.1371/journal.pone.0022147.g002

variations in gene expression between the lines over the 8-hr time interval.

Among the ANOVA list of differentially-expressed genes, 106 genes showed higher expression levels in the resistant line, whereas 96 genes showed higher expression levels in the susceptible line. Table 3 presents a list of the most differentially-expressed genes between the lines at 8 hrs. Two genes *(Irf4* and *hook1)* showed a complex expression pattern over time and their expression varied in both cell lines at both 3 and 8 hrs post-stimulation. Among the differentially-expressed genes, a proportion of genes are known to have immune system-related functions. Expression of some other important immune genes (*ilrap*, *myd88*, *ido1*, *fabp7*, and *il12rb1*) was also found to be different between animals of the two lines. Genes coding for proteins involved in the classical complement pathway were also found to be differentially expressed between the lines upon *HK-Sa* stimulation (for example, *c1qa, b* and *c* were expressed at higher levels in the resistant line). Furthermore, expression of *cd59*, which is a regulator of the complement, was also found to be up-regulated at T8 in the resistant line. Expression of MHC 1 was higher in the resistant animals as compared to susceptible animals.

Genes belonging and related to the TRAF family (*traf4*, *traf7*, and *traf3ip2*) were found to be differentially expressed between the lines, as were a few genes coding for matrix metalloproteinase family members (*mmp9* and *mmp12*). Among differentially-expressed genes, a number of genes belonged to the tripartite motif family (*trim2*, *trim39* and *trim45*). Several molecules involved in cell to cell adhesion were also differentially expressed between the lines, such as *cdh3* which was expressed at a higher level in the resistant animals, and *icam1* and *icam3* which were down-regulated in the same line. *Ssrp1, prg3, lama3,* and *gjb2* were among the most over-expressed genes in the resistant line whereas *postn*, *tmem87b*, *olfml3*, *naga* and *tnc* were the least expressed genes in that line.

Fifteen differentially-expressed genes were selected and their quantification was done through RT-qPCR. For most of differentially-expressed genes between lines, a strong correlation (r = 0.7–0.9) existed between microarray and RT-qPCR results. Statistical Mann-Whitney tests were conducted on expression data and a minimum significance of $p<0.05$ was observed, validating at the same time the microarray results on a panel of genes. Data are presented as a ratio of genes of the resistant over the susceptible line (Fig. 4).

Gene Network Analysis of differentially-expressed gene lists

Systemic identification and grouping of differentially-expressed genes into biological networks was performed using three data mining software packages (Ingenuity Pathway Analysis, Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery and Innate immune DataBase). Ingenuity Pathway Analysis (IPA) was conducted using human ortholog names (HUGO terms).

We first analyzed the networking of genes showing time-dependent expression after staphylococcal stimulation. Immunological disease and inflammatory processes were among the top biological functions that came up with highly significant p-values of (5.25×10^{-16}–2.18×10^{-06}) and (9.11×10^{-16}–1.94×10^{-06}) respectively. Moreover, 112 and 105 molecules belong to these networks and most of the genes from the initial 419-gene list were found in link with immune system pathways. IPA also gave a list of top canonical pathways such as IL-10 signaling, dendritic cell maturation, IL-12 signaling and production in macrophages, ILK signaling, TNFR1 signaling, MIF regulation of innate immunity, communication between innate and adaptive immune cells, T helper cell differentiation and the role of pattern recognition

Table 1. List of the top differentially expressed genes (BH1% and FC>2) at 8 hrs post stimulation.

Gene regulation[a]	Gene symbol	Gene description	Probe ID	Genebank accession number
Up[b]	CYR61	Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	A_70_P036181	DY511533
	GMCSF	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	A_70_P039321	NM_001009805
	TGLN	Transgelin	A_70_P069051	DY507201
	GEM	GTP binding protein over expressed in skeletal muscle	A_70_P063336	EE783131
	TNFRSF18	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18	A_70_P007606	EE814846
	CARPB2	Cellular retinoic acid binding protein 2	A_70_P018436	DY495812
	EDN1	Endothelin 1	A_70_P051286	NM_001009810
	CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	A_70_P016862	LO7939
	DLL4	Delta-like 4 (Drosophila)	A_70_P059611	DY504356
	GADD45B	Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	A_70_P009501	DY491466
Down[c]	C-FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	A_70_P016316	EE779059
	CCR3	Chemokine (C-C motif) receptor 3	A_70_P051117	NM_001009241
	SLC38A9	Solute carrier family 38, member 9	A_70_P000886	FE026967
	IFI44	Interferon-induced protein 44	A_70_P006501	EE782051
	EDNRB	Endothelin receptor type B	A_70_P041851	AF349439
	LPAR6	Lysophosphatidic acid receptor 6	A_70_P039016	EE833955
	ARHGDIB	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	A_70_P013521	EE872563
	TRAF3IP3	TRAF3 interacting protein 3	A_70_P054601	EE746178
	SULF2	Sulfatase 2	A_70_P049492	FE023233
	CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	A_70_P016256	EE753172

[a]mode of expression of gene.
[b]up-regulation at three time point (0, 3, and 8 h).
[c]down-regulation at three time points (0, 3, and 8 h).
doi:10.1371/journal.pone.0022147.t001

receptor in the recognition of bacteria and viruses with a FDR 1%, and a gene ratio>10% (Fig.5).

Moreover, biological roles were suggested for a list of the most-differentially expressed genes between the two lines (FDR 1%; FC>2, n = 112 genes). The most relevant biological networks were related to antimicrobial response, inflammatory response and infectious disease. Top canonical pathways included (1) acute phase response signaling, (2) leukocyte extravasation signaling and (3) complement system with significant p-values of 1.11×10^{-02}, 1.54×10^{-02} and 1.33×10^{-02} respectively.

Further analysis of gene interactions and pathways was performed using the differentially-expressed genes at the three time points independently. We observed that top networks obtained at T0 deal with cell to cell signaling and interaction, inflammatory response and tissue development with 45 and 26 molecules taking part in these networks, respectively. Top diseases and disorders associated were inflammatory response, inflammatory diseases and immunological disease with highly significant p-values of (9.97×10^{-07}–1.57×10^{-02}), (5.46×10^{-05}–$1.57\times^{-02}$) and (1.07×10^{-04}–$1.57\times^{-02}$), respectively. Interestingly, the canonical pathways identified at T0 were IL-17 signaling, integrin signaling and B cell receptor signaling with statistical significance levels of 2.73×10^{-03}, 4.19×10^{-03} and 5.57×10^{-03} respectively. Similarly, the comparison of gene expression between lines at the T3 time-point showed that (1) cell-to-cell signaling and interaction, cellular assembly and organization and (2) antimicrobial response, inflammatory response, cellular development are the main networks with 25 and 17 genes taking part in these networks, respectively. The main canonical pathway identified at T3 was ILK signaling (4.48×10^{-03}). Moreover, independent IPA analysis of the T8 list indicated the involvement of complement system pathways and aryl hydrocarbon receptor (*ahr*) signaling pathway. The combined analysis of all three differentially-expressed gene lists (T0, T3 and T8) showed similar results to those obtained with ANOVA, but an additional canonical pathway dealing with the role of pattern recognition receptors in the recognition of bacteria and viruses showed up.

The biological significance of genes was also investigated by analyzing the over-expressed genes in each line separately at each time point by using DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery). Major GO biological processes (BP) terms for susceptible animals were: (1) cell adhesion, cytoskeleton protein binding and (2) cell motion at T0, (1) glycosylation site N (2) signal peptide and (1) response to wounding at T3, and (1) endoplasmic reticulum part, (2) cell fraction, and (3) vesicle-mediated transport at T8.

In the resistant line, the major GO BP terms obtained were (1) ribonucleoprotein and (2) mitochondrion at T0, no statistically significant GO BP terms were identified at T3, and (1) classical complement pathway and (2) response to wounding and inflammatory response were found to be significant GO BP terms at T8 (Fig. 6).

Table 2. Post stimulation (3 and 8 hrs) differential kinetics of gene expression in BM-DCs, a comparison of fold change measured by microarrays and RT-qPCR.

	Microarray		RT-qPCR	
Gene Name	**T(3 hrs)**	**T(8 hrs)**	**T(3 hrs)**	**T(8 hrs)**
GCSF	3.6	9.9	5.43	11.14
MCSF	5.82	5.65	10.56	5.06
GMCSF	8.12	15.11	7.24	21.13
IL-6	3.37	2.91	5.25	4.94
IL-10	2.67	3.01	2.2	3.61
IL-12	1.4	4.54	1.76	5.23
IL-15	1.15	3.27	2.96	54.96
CASP3	−1.49	2.15	1.05	2.5
TNFRSF18	4.31	7.98	8.86	10.97
FGF18	6.78	6.5	7.52	6.35
CFOS	−6.5	−9.5	0.15	0.17
CCR3	−2.23	−3.58	0.51	0.34
EDNRB	−1.8	−4.1	0.35	0.17
SULF2	−1.2	−3.2	0.85	0.36
CDH1	−1.65	−4.92	0.37	0.17
MLLT1	5.09	−1	3.05	1.01
SFRS5	−4.2	−1.6	0.2	0.25
MTIE	−3.57	−2.98	0.96	0.87

RT-qPCR data are normalized according to multiple housekeeping genes (*rp19,hprt, tyr* and *gapdh*) by using $2^{-\Delta\Delta}$method and present expression ratio of resistant over susceptible animals.

doi:10.1371/journal.pone.0022147.t002

To identify more immune-related gene functions and interactions, a combined list of DE genes at T0, T3 and T8 was analyzed using InnateDB and transendothelial leukocyte migration was found to be the most significant GO term for susceptible animals when compared to resistant animals. The classical complement pathway was identified as the major pathway and is consistent with analysis using IPA and DAVID.

On the basis of differentially-expressed genes and biological processes obtained through networking analysis, it seems obvious that dendritic cells of animals belonging to resistant and susceptible lines have different transcriptional profiles not only at their differentiation steady state, but also upon interaction with *Staphylococcus*. Based on differentially-expressed gene lists, a certain number of hypotheses can be generated and linked with functions of the immune system. Furthermore, we observed that differentially-expressed genes belonged to both innate and adaptive immune response of DCs. Most of the genes identified showed a sustained up- or down-regulation and this clearly implies that the biological processes they sustain are important throughout the stimulation process. These differentially-expressed genes might explain the different outcomes of infections between lines obtained by divergent selection based on resistance to *Staphylococcus* infections.

Discussion

We applied transcriptome analysis to investigate global gene signatures in BM-DCs after exposure to heat-killed *S. aureus*, and as a hypothesis-generating tool to identify differentially-expressed genes and pathways between animals having different degrees of susceptibility to staphylococcal infections. Dendritic cells have always been a center point of discussion in the context of infections by various pathogens, and their interaction with different bacteria and viruses have already been studied in details in different organisms [25–30].

The dendritic cells used in our study were generated from bone-marrow progenitors in the presence of recombinant ovine GM-CSF. Generation of dendritic cells from bone- marrow cultures is considered a standard protocol to study interactions with pathogens and is widely used in different species [31–34]. Although DCs could be isolated from mammary tissue or collected from lymph ducts in sheep, we preferred *in vitro*-generated DCs to avoid the interference of environmental (nutritional, hormonal, …) factors on DC gene profiles. In addition, the presence of pre-existing infections within such tissue could interfere with the analysis of basal gene expression, and jeopardize the study of the genetic control of the response to *Sa.*

The analysis of microarray-based transcriptional data from DCs were conducted to test two major axis of our experiment, *i.e.* gene modulation after exposure to *HK-Sa* over a time scale of 8 hrs, and comparison of the differential transcriptomic profiles between two divergent lines upon contact with *Sa.* The greater number of genes expressed at 3 hrs clearly indicates a rapid response of ovine DCs to staphylococcal stimulation.

The expression of major pro-inflammatory cytokines and chemokines (*il8* and *cxcl10*) was up-regulated at 3 and 8 hrs as previously described by others [35]. This clearly shows that stimulated dendritic cells are able to attract immature DCs, and activate T cells as well as other immune cells of the innate immune system at the site of inflammation. The genes coding for colony-stimulating factor (*csf1*, *−2* and *−3*) and *il15*, respectively involved in the production, differentiation and function of granulocytes, macrophages and NK cells, were highly up-regulated after DC stimulation. Over-expression of conventional and T helper response cytokines shows the potency of stimulated DCs to prime and induce expression of Th1-, Th2- and Th17-related cytokines by CD4+ T cells, and regulate the inflammatory response associated to that kind of infection. More precisely, the higher expression levels observed for *il6* and *il23* strongly suggest the involvement of Th17 response to *Staphylococcus* infections as recently described [36,37], although no difference between the lines has yet been identified for that particular T-cell phenotype.

Gene network analyses show that the IL-10 signaling pathway is mobilized after stimulation with *HK-Sa.* After interaction with gram-negative bacteria, DCs express high levels of IL-12 and produce no or very little IL-10 [38]. In contrast, *HK-Sa*-stimulated DCs equally transcribe *il10* and *il12* as early as 3 hrs after stimulation, although expression of *il12* tends to be higher at 8 hrs post-stimulation. This could explain why staphylococcal infections often become chronic due to the immunosuppressive activity of IL-10, as compared to infections by gram-negative bacteria where inflammation is more acute and of higher magnitude. Among other mobilized genes, we found that transcription of *Irak2*, which plays a central role in the TLR-NFkappaB signaling axis, was increased. If it is then translated into protein, its up-regulation could create an amplification loop [39]. Conversely, *cfos* which is involved in the same signaling pathway was repressed.

A total of 73 genes were down-regulated after interaction of dendritic cells with *HK-Sa.* Among these down-regulated genes, the chemokine receptor *ccr3*, which is highly expressed in immature dendritic cells, and reported to be repressed in inflammatory conditions was found to be down-regulated [40]. By contrast, the transcription of markers of DC maturation (*cd40* and *cd83*) was increased after stimulation and clearly showed that

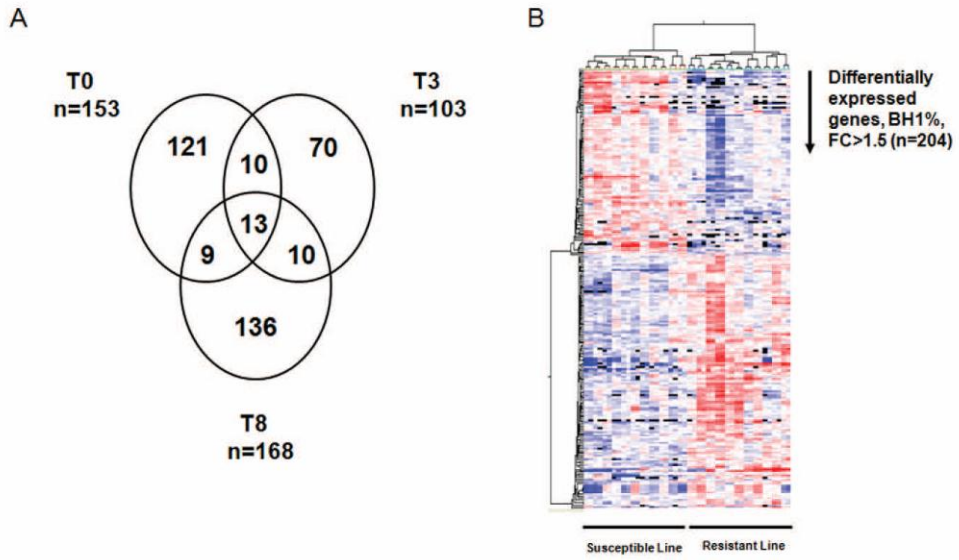


Figure 3. Transcriptional profiling of DCs in resistant and susceptible lines. (A) Venn diagram presenting number of differentially-expressed genes between the two lines at three different time points (Volcano plot analysis, FC>1.5). (B) Distinct transcriptional profiles of dendritic cells belonging to resistant and susceptible lines. Clustering analysis of differentially-expressed genes (ANOVA analysis, BH1%, FC>1.5, n = 204).
doi:10.1371/journal.pone.0022147.g003

maturation has occurred, whereas genes involved in cell to cell signaling and cell adhesion (*sulf2* and *cdh1*) were repressed.

Thus, our results and list of genes agree with some of the previously published work on DCs in inflammatory conditions [22,41–44]. Indeed, Torri *et al.* identified a set of 54 genes associated with inflammation and among these genes, 14 genes (*ccl22*, *ccr10*, *ccr7*, *cd40*, *cd83*, *eif2b1*, *gadd45b*, *il4i1*, *irak2*, *il-6*, *il-1b*, *il12rb1*, *il-2ra* and *tnfx*) are present in our gene list [22]. This indicates that a similar pattern of gene expression exists between species in inflammatory conditions.

In a second step, we concluded that dendritic cells from two different genetic groups present distinct transcriptional profiles and that this could explain their varying ability to overcome *S. aureus* infection. A total of 204 genes were found to show different expression profiles in BM-DCs from the two lines over a time scale of 8 hrs. Interestingly, gene expression was already different before stimulation. We may therefore speculate that these differences actually reflect the genetic origin of DCs or that they are perhaps related to the GM-CSF-driven differentiation of DCs and a different capacity of the two lines to respond to GM-CSF. Indeed, in mice, two lines have been generated on the difference of intensity of the acute inflammatory response (AIR). BM precursor cells from AIRmax mice have been reported to display higher levels of expression of CD131, the beta chain of GM-CSFR, at their cell surface [45]. Using gene networking analysis, we found that two genes (*rras2* and *bcl2a1*) involved in GM-CSF signaling are up-regulated in the resistant line. Further investigations are needed to clarify this observation in our model.

The production of inflammatory and T helper-differentiating cytokines by DCs has been shown to contribute to severity of bacterial infections [46,47]. In the past, Th2 type cytokines IL-4 and IL-10 were associated with resistance to *Staphylococcus* infection in mice [47]. Previous studies have shown that DCs from *L. major* susceptible mice produced low quantities of IL-1α and IFNγ in response to LPS and this was thought to be responsible for different outcomes after infection by the parasite [21]. By contrast, no significant difference was observed in the expression of any major immune system pillar cytokines and chemokines between susceptible and resistant animals in our study.

Networking analysis of differentially-expressed genes between two lines revealed two major pathways. In the susceptible line, genes involved in the leukocyte transendothelial migration were expressed at a higher level which could be related to our clinical findings since the selection criteria of the animals are based on elevated leukocyte concentration in the milk. In resistant animals, genes involved in the classical complement pathway were expressed at a higher level.

Among the differentially-expressed genes, few genes involved in the IL-1R signaling were over-expressed in the susceptible line. Expression of *myd88* and *ilrap* was lower in the resistant line. Miller *et al.* extensively described the role of the IL-1R/Myd88 and TLR2/Myd88 pathways in the recruitment of neutrophils and clearance of staphylococcal infections in mice, and demonstrated the dominant role of IL-1R signaling over TLR signaling [48]. They showed that the clearance of *Staphylococcus* infection in chimera mice reconstituted with IL-1R-deficient or Myd88-deficient BM was the same. Although the expression of IL-1R or MyD88 by recruited BM-derived cells had no impact on the outcome of the infection, IL-1R/Myd88 signaling by resident cells, at the site of infection, controlled the outcome of infection. Hence, it is difficult to conclude at this stage whether there is a difference in the signaling cascade from IL-1R/TLR between the two lines

Table 3. List of the top differentially expressed genes (BH1% and FC>1.5) at 8 hrs post-stimulation between the resistant and susceptible lines.

Gene regulation[a]	Gene symbol	Gene description	Probe ID	Genebank accession number
Up[b]	SSRP1	Structure specific recognition protein 1	A_70_P054656	EE764907
	PRG3	Proteoglycan 3	A_70_P055056	EE768552
	MMP12	Matrix metallopeptidase 12 (macrophage elastase)	A_70_P006416	EE782850
	APRT	Adenine phosphoribosyl transferase	A_70_P027731	EE764223
	LAMA3	Laminin, alpha 3	A_70_P019151	EE782590
	GJB2	Gap junction protein, beta 2	A_70_P006901	EE757451
	CLDN4	Claudin 4	A_70_P059323	CD286830
	CLDN5	Claudin 5	A_70_P013486	DY498156
	UQCRQ	Low molecular mass ubiquinone-binding protein	A_70_P019896	EE823241
	TRIM2	Tripartite motif-containing 2	A_70_P066136	EE847713
Down[c]	POSTN	Periostin, osteoblast specific factor	A_70_P033761	EE857251
	TMEM87B	Transmembrane protein 87B	A_70_P057056	EE780570
	GPNMB	Glycoprotein (transmembrane) nmb	A_70_P017881	FE033937
	ADORA3	Adenosine A3 receptor	A_70_P051241	NM_001009775
	PIK3IP1	Phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1	A_70_P038251	EE828789
	OLFML3	Olfactomedin-like 3	A_70_P059006	CU655165
	NAGA	N-acetylgalactosaminidase, alpha	A_70_P069481	EE822585
	FAM198B	Family with sequence similarity 198, member B	A_70_P009511	EE772814
	TNC	Tenascin C	A_70_P018186	EE825947
	TXNIP	Thioredoxin interacting protein	A_70_P016181	EE852061

[a]mode of expression of the gene.
[b]up-regulation at three time points (0, 3 and 8 hrs).
[c]down-regulation at three time points (0, 3 and 8 hrs).
doi:10.1371/journal.pone.0022147.t003

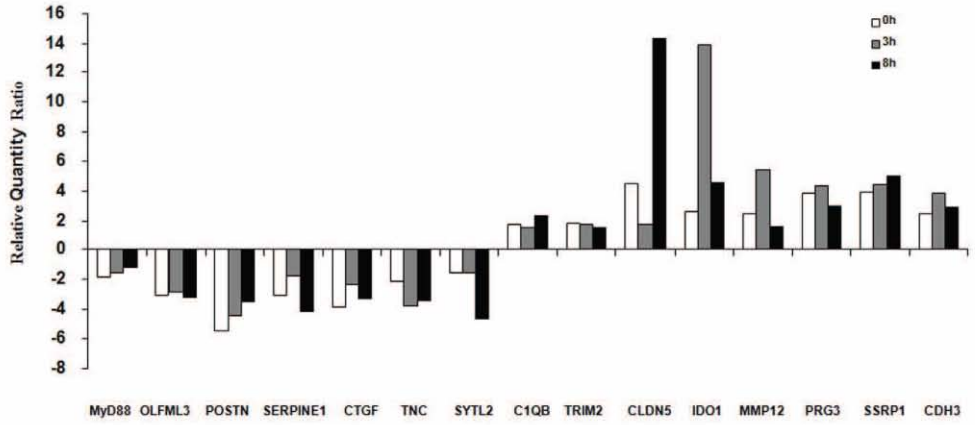


Figure 4. RT-qPCR analysis (Biomark system, Fluidigm) of differentially-expressed genes between resistant and susceptible lines. Data represent the expression ratio of resistant animals over susceptible animals at three different time points (0, 3 and 8 hrs). Relative data were normalized with common reference genes (*rp19,hprt,tyr* and *gapdh*) by using $2^{-\Delta\Delta}$method.
doi:10.1371/journal.pone.0022147.g004

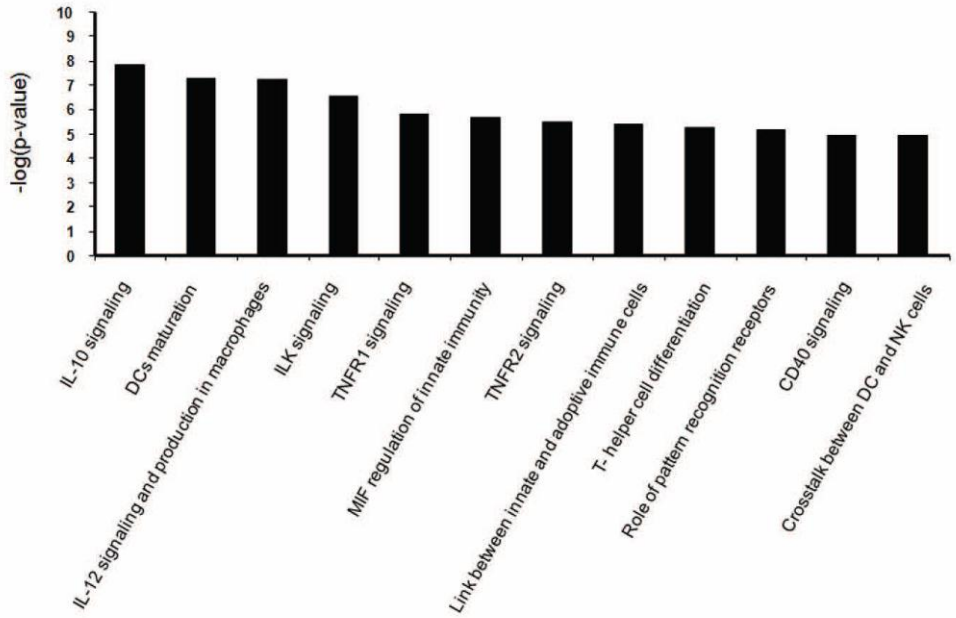


Figure 5. Top canonical pathways obtained by IPA analysis of differentially-expressed genes (n = 419, FC>2, BH 2%) between three time points (0, 3 and 8 hrs).
doi:10.1371/journal.pone.0022147.g005

but the up-regulation of both *myd88* and *ibrap* genes certainly suggests that IL-1R signaling is increased in the susceptible line.

DCs are known to promote Th1 response via the secretion of IL-12. In our study the expression of *Il12rb1*, a chain of the IL-12 receptor complex, was increased in the cells of the resistant animals. Although the expression of *il12* was not significantly different between the lines, resistant animals tended to produce more *il12* mRNA after stimulation (1.6 fold). Since IFNγ is known to stabilize the expression of IL-12Rβ, it is tempting to speculate that the resistant line has a more potent Th1 response due to an increased production of IFNγ compared to the susceptible line [36]. Previous studies have shown that default of *Il12rb1* gene expression is associated with susceptibility towards Mycobacteria and malarial infections [49,50], but until now, predisposition to staphylococcal infections has not been reported in relation with this default.

It is generally considered that not only initiation of an inflammatory response is required but also that complete shutdown of the inflammatory process is essential for the ultimate outcome of an infection. Interestingly, we observed that *ido1* (indoleamine 2, 3-dioxygenase 1) expression was increased in the resistant line. *ido1* is reported to help catalyzing tryptophan and to block the inflammatory response by promoting the differentiation of regulatory T cells (Treg) [51]. Some previous studies have shown that the inhibition of *ido1* promotes the production of NK cells and the production of IFNs and further aggravates inflammation [52]. Altogether, the high level of *ido1*expression in the resistant line may suggest that the DCs from resistant animals can not only implement an efficient inflammatory response against staphylococcal infections via conventional IL-1R/TLR pathway signaling, but can also shut it down as soon as infection clearance begins. This could help to prevent the detrimental effects observed in the susceptible line due to an uncontrolled and chronic inflammatory response.

During inflammation, the clearance of apoptotic bodies is thought to be an important physiological event to prevent the promotion of inflammation and autoimmunity whilst also limiting tissue toxicity. *C1q*, the first component of complement system, is one of the key molecules involved in the recognition and clearance of apoptotic bodies [53–55]. Interestingly, one of the gene networks obtained in our study contains all three subcomponents of *C1q*, which showed highly up-regulated expression levels in the resistant line. *C1q* is not only involved in the uptake of apoptotic cells by DCs, but also in phagocytosis, which installs a combination of IL-6 and TGFβ production through recognition of pathogen-associated molecular patterns [56] and phosphatidyl-serine [57] exposed on apoptotic cells. This combination of IL-6 and TGFβ instructs Th17 differentiation [58]. Furthermore, the ingestion of apoptotic cells can convert immature DCs into tolerogenic DCs and therefore ultimately leads to the conversion of naïve T cells into Foxp3-positive Treg [59]. Hence, the up-regulation of *C1q* in the resistant animals suggests that unnecessary inflammation might be avoided by the efficient clearance of apoptotic bodies, programming of the cytokine profile towards Th17 differentiation and simultaneous regulation of the inflammatory response through Treg.

Among the differentially-expressed genes between lines, several TRAF family genes, such as *traf4*, were over-expressed in the

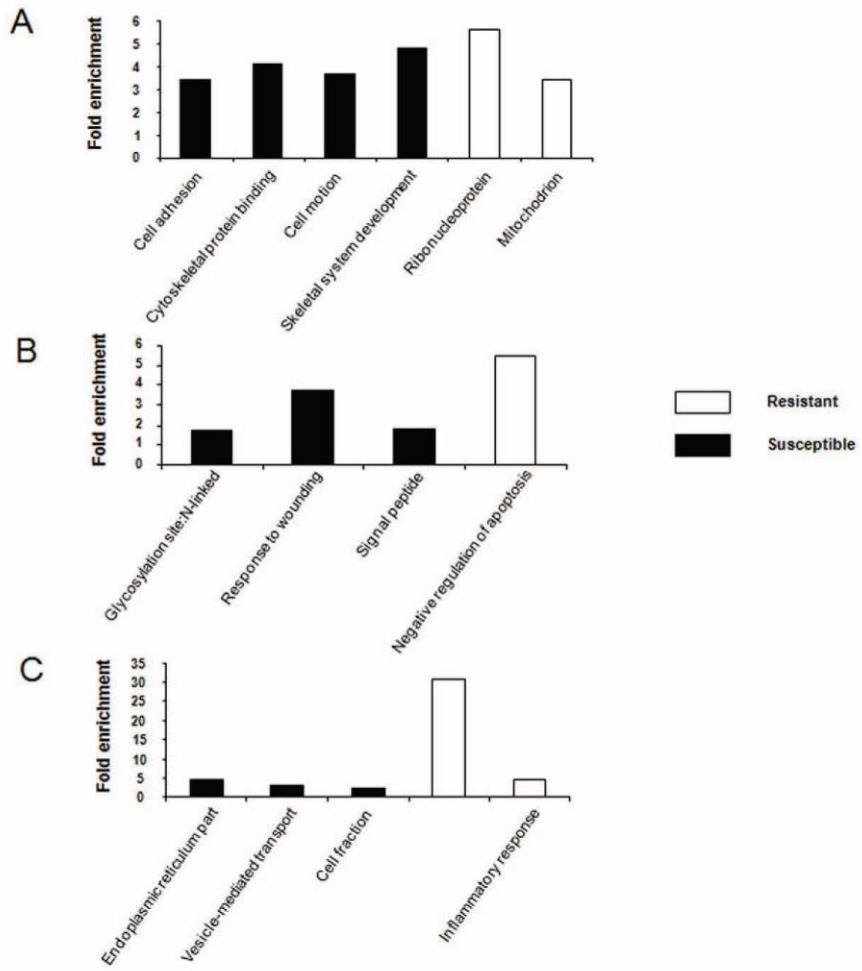


Figure 6. Enriched BP GO terms for over-expressed genes in each line at three independent time points by DAVID. (A) GO BP terms obtained at T0 (B) GO BP terms obtained at T3 (C) GO BP terms obtained at T8.
doi:10.1371/journal.pone.0022147.g006

resistant line. *Traf4*, unlike other genes of TNF receptor associated family genes, is involved in DC migration. Reduced migration of dendritic cells was observed in *traf4−/−* mice [60]. Hence, DC migration could be faster in the resistant line. Moreover, several genes belonging to the matrix metalloproteinase family (*mmp1* and *mmp12*) are over-expressed in the resistant line. Although its antimicrobial properties have not been reported in dendritic cells, the role of MMP12 in macrophages has been recently identified. *Mmp12*$^{-/-}$ mice were shown to have impaired bacterial clearance and increased mortality upon infection with gram-positive bacteria [61]. Several genes belonging to two major families, the claudin family (*cldn1*, *cldn4* and *cldn5)* and the TRIM family (*trim2*, *39* and *45*), were found to be differentially modulated after stimulation in the two lines. Since the importance of the genes belonging to the claudin and Trim families has been evidenced in the context of viral infections and cancer, it is worth noting that they may also play a role in the response to bacterial infections.

In conclusion, we have successfully exploited transcriptomic analysis to obtain a *Staphylococcus*-induced ovine DC gene signature. We have also developed a series of hypotheses on the basis of the genes found to be differentially-expressed between animals of the susceptible and resistant lines. Whether or not the susceptibility towards *Staphylococcus* infections completely depends upon the differentially-expressed genes identified using DC

transcriptomics remains unknown at this stage. But the differences observed for genes with immune-related functions lead us to speculate on a central role for dendritic cells in the context of staphylococcal infections. Hence, the differentially-expressed genes identified in this study should be further investigated using laboratory models to confirm our hypothesis. To our knowledge, this the first study investigating immunity against *S. aureus* in an outbred animal model of such genetic variability. Our study has opened some new avenues which will need further exploration and lead to a better understanding staphylococcal immunity and resistance.

Materials and Methods

Animals

Two-year old ewes (Lacaune breed) from resistant (n = 4) and susceptible lines (n = 4) were issued from a divergent selection on the basis of estimated breeding values for the somatic cell score, an indicator of intra-mammary infections; they had no parental links. Previous studies conducted on these genetic lines indicated a significant difference of susceptibility to intramammary infections by *Staphylococci* [14]. Since these infections are principally due to *Staphylococcus* spp, the genetic trait is highly related to the susceptibility to this bacteria genus. Moreover, the ewes used in that study were challenged twice with two different species (*Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*) and the results of bacteriology, disease severity and abscess formation indicated a significant difference of susceptibility between the groups (EF, RR, GF, manuscript in preparation). The ewes were thus chosen as representative of their genetic lines. Animals were sacrificed in accordance with local regulations (Agreement number N°31-2010-67). This study was approved by the INRA animal ethics committee (France).

Generation and stimulation of bone marrow-derived dendritic cells

The DCs used in this study were generated from bone-marrow progenitors following a protocol previously described by our group [62]. Briefly, bone marrow was prepared from the sternum after longitudinal section in two halves and scraping of the red marrow. Bone marrow cells were released by crushing the marrow in a 100 mm Petri dish filled with 10 ml HBSS medium (Invitrogen). Cells were suspended by carefully pipetting up and down, and were then passed through a 100-µm nylon mesh to remove small pieces of bone and debris. Red blood cells were lysed by ACK treatment for 2–3 min at room temperature. Cells were then suspended in complete RPMI medium and cultured in 100 mm bacteriological dishes at 37°C, 5% CO_2 for 7 days. Complete medium was RPMI 1640 (Invitrogen) containing 2 mM glutamine, 25 mM HEPES, 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin, 1% sodium pyruvate, 1% essential amino acids, 50 µM β-mercaptoethanol. cRPMI medium was supplemented with 20 ng/ml ovine recombinant GM-CSF. Fresh medium containing the same concentration of recombinant cytokine was added every 3 days. After seven days of culture, cells were characterized by flow cytometry. BM-DCs were seeded in cell culture plates at a concentration of $1.5x10^6$ cell/ml and stimulated with 20 µg/ml Pansorbin for 3 and 8 hrs.

RNA extraction, amplification and labeling

Total RNA was extracted using the classical extraction method with phenol/chloroform (TRIzol, Invitrogen). Extracted RNA was further purified on RNeasy columns (Qiagen). Quantification was performed using a spectrophotometer (NanoDrop Technologies) and RNA quality was assessed using an Agilent Bioanalyzer 2100 slide. A RNA Integrity Number (RIN) index above 9 was measured for all samples. 200 ng of RNA was converted into double-stranded cDNA and amplified with the Amino Allyl Message Amp II aRNA amplification procedure (Ambion kit) and then labelled with Cy3 and Cy5 for hybridization in a two-colour dye-swap experimental design.

Hybridization, scanning and raw data storage

Three ovine 019921 slides (Agilent Technologies), with eight microarrays each containing 15,008 probes were used. The chips were hybridized with labeled RNA at 65°C for 17 hrs and then washed according to the manufacturer's protocol. Intensity values were collected with a 4000B Axon scanner. Two channel images were imported into the Agilent's Feature Extraction software for feature (spot) finding and alignment. Features were flagged as present/absent, saturated/unsaturated, uniform/non-uniform and pixel intensities for features and background were recorded.

Pearson correlation coefficients taken from plotting signal intensity values of dye-swap chips across all genes validated that duplicate experiments were nearly similar. Output Feature Extraction result (.txt) files were transferred into GeneSpring GX 11. LOESS-normalized data were imported as a single channel data to perform probe by probe analysis and a percentile shift to the median was performed for normalization across arrays. Data were filtered to remove spots that were of very low intensity, saturated, or not uniform. In order to keep only genes that were very representative of one condition, only genes that were positively flagged in all samples for at least one condition (resistant line at T0, T3, and T8, and susceptible line at T0, T3, and T8) were conserved for further analysis.

Annotation of ovine microarray

On the ovine array, 15,208 different probes are present, but only 8,847 of these are annotated with the Human ortholog HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) (http://www.sigenae.org/, sheep oligo annotation version 6 of 2010/06/14). More genes were annotated using GeneBank and Basic Local Alignment Search Tool program on the NCBI website (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). A threshold value of 80% hit score was considered as a minimum criterion.

Statistical analysis of microarray data

Statistical analysis of microarray data was carried out using the commercially available software package Genespring®. Two-way ANOVA by Line and Time was performed to select genes that were differentially expressed between different conditions with a p-value corrected by Benjamini Hochberg false discovery rate. The interaction between Line and Time was tested, but it was not significant and was removed from the statistical model. The expression profiles for these genes were clustered over the line or over the time using the hierarchical clustering of GeneSpring based on the Pearson-centered gene distance. Information about this experiment has been deposited in NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) with accession number (GSE24448). All data is Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) compliant.

Gene networking analysis

Three freely available software packages were used to interpret the biological functions of the gene lists. Initially networking analyses were conducted using Ingenuity Pathway Analysis, version 7.5 (http://www.Ingenuity.com). In addition to generating

biological networks from a list of selected genes, this software provides biological functions and canonical pathways from HUGO ortholog names of the genes that were imported into the program. A network of genes is created when a gene regulates the function of another one. To generate a network, the IPA software adds other genes and/or different molecules that are linked with two focus genes. Gene Ontology (GO) Term analyses were performed with DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (http://david.abcc.ncifcrf.gov/) by using an independent list of differentially-expressed genes at three time points (T0, T3 and T8) separately. Transcription factor binding sites (TFBS) over-represented in differentially-expressed gene list were identified using InnateDB (http://www.innatedb.com).

Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

cDNAs were generated from 300 ng of clean total RNA of 24 samples using the Superscript III First Strand Synthesis System Kit (Invitrogen), and random hexamer primers, following the manufacturer's instructions.

The relative mRNA expression levels were verified using the same RNA samples that had been analyzed in microarrays. For quantification of mRNA transcripts, primer pairs were designed using Primer3 [63] based on the relevant ovine mRNA sequences and synthesized commercially (Eurogentec). The specificity of designed primers was checked with other tools (BLAST, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) and Primer Expressꞏ. For some genes for which ovine sequence was not available, a comparative gene alignment of bovine, human, rat and mouse sequences was preformed, and primers were then designed on the most conserved regions between these species. Optimal annealing temperatures were determined for each primer pair, and the primers were checked for absence of primer dimers and efficiency before use. Primers used in RT-qPCR experiments are listed in Table S4.

RT-qPCR was performed following two different protocols according to the number of genes to be tested. Expression of few genes was tested in pre-microarray experiments and RT-qPCR reactions were carried out on a 7300 machine (Applied Biosystems). All assays were carried out in duplicate and each reaction contained 5 µl of diluted cDNA with 2.5 µl (0.5 µM) of each forward and reverse primer along with 12.5 µl of Power Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

The high-throughput microfluidic qPCR platform BioMark™ (Fluidigm) was used for post-microarray qPCR analysis running the 48.48 dynamic-array. Pre-amplification of cDNA for all samples was done with a pool of forward and reverse primers. Five µl pre-amplification reaction contains 1.25 µl of pool of primers with 2.5 µl TaqMAN®PreAmp Master Mix and 1.3 µl cDNA. Pre amplification of cDNA was carried out on an ABI thermocycler with an initial step of activation (95°C for 10 min) followed by 14 cycles of two steps (95°C for 15 sec and 60°C for 4 min).

The sample reaction mixtures had a final volume of 6.7 µl and made of 1.7 µl of diluted pre-amplified cDNA and 5 µl of sample pre-mix containing 20x EvaGreen, 20x DNA Binding Dye Sample loading reagent and 2x Taqman Gene Expression Master mix. The primer reaction mixtures had also a final volume of 6.7 µl and were made up of 5 µl of 2X Assay Loading reagent (Fluidigm) and TE 1X and 1.7 µl of a mixture of reverse and forward primers (20 µM). Empty dynamic array was first primed with oil solution in the NanoFlex™ 4-IFC Controller (Fluidigm) to fill its control valves for 20 min.

Five µl of sample reaction mixtures were then loaded into the sample wells carefully avoiding any bubbles, and 5 µl of primer reaction mixtures were loaded into the assay wells. The dynamic array was then placed again into the NanoFlex™ 4-IFC Controller for loading and mixing. The mixing takes place by diffusion between the reaction chambers filled with sample reagent and adjacent containers filled with the appropriate primers mix for 90 min. Loaded dynamic array was then transferred to the BioMark™. The BioMark™ qPCR cycling program was 50°C for 2 min for amplification phase and 10 min at 95°C for activation of the hot-start enzyme, followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 60°C for 1 min, and elongation at 72°C for 20 s. Melting curve analysis was performed after completion of the qPCR collecting fluorescence intensities between 60 and 95°C.

RT-qPCR data analysis and normalization

Specific amplification of each targeted cDNA was confirmed by melt curve analysis. Measured Ct values were exported from the BioMark™ software to Excel for data analysis. qPCR technical replicates of samples were averaged and expression ratios were calculated by the delta delta Ct method normalized to the multiple housekeeping genes [64]. Statistical significance of analysis was calculated using Mann-Whitney tests. Beforehand the stability of 10 house keeping genes, previously mentioned in the literature, was checked in our 24 samples and data obtained was then analyzed by GeNorm, a software package freely available for research use. Hence, RT-qPCR data were normalized against the four most stable genes (*rp19*, *hprt*, *tyr* and *gapdh*) found by GeNorm analysis.

Supporting Information

Table S1 List of the differentially expressed genes in the time course identified by ANOVA of microarray data (FC>2, BH1%, n = 419) at 0, 3 and 8 hrs.
(XLS)

Table S2 List of the differentially-expressed genes between resistant and susceptible lines at 0, 3 and 8 hrs by ANOVA of microarray data (FC>1.5, BH1%).
(XLS)

Table S3 List of the differentially-expressed genes between the two lines by Volcano plot analysis (FC>1.5) at 0, 3 and 8 h independently.
(XLS)

Table S4 List of primer sequences used in RT-qPCR.
(XLS)

Acknowledgments

The authors would like to thank Olivier Boucher for technical support in RT-qPCR experiments and Lidwine Trouilh for microarray experiments at the Genomic platform GenoToul Toulouse-Midi-Pyrénées. We also appreciate Philippe Bardou's assistance when submitting microarray data to Gene Expression Omnibus (GEO). The authors especially thank the INRA and ENVT staff members in charge of animal breeding and care.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MT CB EF RR GF. Performed the experiments: MT CB EF CC CT. Analyzed the data: MT CB CRG RR GF. Contributed reagents/materials/analysis tools: MRA. Wrote the paper: MT GF.

References

1. Cohn LA, Middleton JR (2010) A veterinary perspective on methicillin-resistant staphylococci. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) 20: 31–45. doi:10.1111/j.1476-4431.2009.00497.x.
2. Catry B, Van Duijkeren E, Pomba MC, Greko C, Moreno MA, et al. (2010) Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health. Epidemiol Infect 138: 626–644. doi:10.1017/S0950268810000014.
3. Bogaerts A, Beets I, Temmerman L, Schoofs L, Verleyen P (2010) Proteome changes of Caenorhabditis elegans upon a Staphylococcus aureus infection. Biol Direct 5: 11. doi:10.1186/1745-6150-5-11.
4. DeLeo FR, Diep BA, Otto M (2009) Host defense and pathogenesis in Staphylococcus aureus infections Infect Dis Clin North Am 23: 17–34. doi:10.1016/j.idc.2008.10.003.
5. Deleo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF (2010) Community-associated meticillin-resistant Staphylococcus aureus. Lancet 375: 1557–1568. doi:10.1016/S0140-6736(09)61999-1.
6. Ben Zakour NL, Sturdevant DE, Even S, Guinane CM, Barbey C, et al. (2008) Genome-wide analysis of ruminant Staphylococcus aureus reveals diversification of the core genome. J Bacteriol 190: 6302–6317. doi:10.1128/JB.01984-07.
7. O'Riordan K, Lee JC (2004) Staphylococcus aureus capsular polysaccharides. Clin Microbiol Rev 17: 218–234.
8. Herron-Olson L, Fitzgerald JR, Musser JM, Kapur V (2007) Molecular correlates of host specialization in Staphylococcus aureus. PLoS ONE 2: e1120. doi:10.1371/journal.pone.0001120.
9. Ardura MI, Banchereau R, Mejias A, Di Pucchio T, Glaser C, et al. (2009) Enhanced monocyte response and decreased central memory T cells in children with invasive Staphylococcus aureus infections. PLoS ONE 4: e5446. doi:10.1371/journal.pone.0005446.
10. von Köckritz-Blickwede M, Rohde M, Oehmcke S, Miller LS, Cheung AL, et al. (2008) Immunological mechanisms underlying the genetic predisposition to severe Staphylococcus aureus infection in the mouse model. Am J Pathol 173: 1657–1668. doi:10.2353/ajpath.2008.080337.
11. Prajsnar TK, Cunliffe VT, Foster SJ, Renshaw SA (2008) A novel vertebrate model of Staphylococcus aureus infection reveals phagocyte-dependent resistance of zebrafish to non-host specialized pathogens. Cell Microbiol 10: 2312–2325. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01213.x.
12. Wu K, Conly J, McClure J, Elsayed S, Louie T, et al. (2010) Caenorhabditis elegans as a host model for community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect 16: 245–254. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02765.x.
13. Ayres JS, Schneider DS (2008) A signaling protease required for melanization in Drosophila affects resistance and tolerance of infections. PLoS Biol 6: 2764–2773. doi:10.1371/journal.pbio.0060305.
14. Rupp R, Bergonier D, Dion S, Hygonenq MC, Aurel MR, et al. (2009) Response to somatic cell count-based selection for mastitis resistance in a divergent selection experiment in sheep. J Dairy Sci 92: 1203–1219. doi:10.3168/jds.2008-1435.
15. Sordillo LM, Streicher KL (2002) Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. J Mammary Gland Biol Neoplasia 7: 135–146.
16. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, et al. (2000) Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol 18: 767–811. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767.
17. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, et al. (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. Science 327: 656–661. doi:10.1126/science.1178331.
18. Liu T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Yajima T, Yoshikai Y (2002) Differences in expression of toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice. Infect Immun 70: 6638–6645.
19. Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku C, Bustamante J, et al. (2003) Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. Science 299: 2076–2079. doi:10.1126/science.1081902.
20. Filippi C, Hugues S, Cazareth J, Julia V, Glaichenhaus N, et al. (2003) CD4+ T cell polarization in mice is modulated by strain-specific major histocompatibility complex-independent differences within dendritic cells. J Exp Med 198: 201–209. doi:10.1084/jem.20021893.
21. Von Stebut E, Ehrchen JM, Belkaid Y, Kostka SL, Molle K, et al. (2003) Interleukin 1alpha promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in Leishmania major-susceptible BALB/c mice. J Exp Med 198: 191–199. doi:10.1084/jem.20030159.
22. Torri A, Beretta O, Ranghetti A, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P, et al. (2010) Gene expression profiles identify inflammatory signatures in dendritic cells. PLoS ONE 5: e9404. doi:10.1371/journal.pone.0009404.
23. Thuong NTT, Dunstan SJ, Chau TTH, Thorsson V, Simmons CP, et al. (2008) Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles. PLoS Pathog 4: e1000229. doi:10.1371/journal.ppat.1000229.
24. Jurkin J, Schichl YM, Koeffel R, Bauer T, Richter S, et al. (2010) miR-146a is differentially expressed by myeloid dendritic cell subsets and desensitizes cells to TLR2-dependent activation. J Immunol 184: 4955–4965. doi:10.4049/jimmunol.0903021.
25. Wang Y, Gorvel J, Chu Y, Wu J, Lei H (2010) Helicobacter pylori impairs murine dendritic cell responses to infection. PLoS ONE 5: e10844. doi:10.1371/journal.pone.0010844.
26. Balboa L, Romero MM, Yokobori N, Schierloh P, Geffner L, et al. (2010) Mycobacterium tuberculosis impairs dendritic cell response by altering CD1b, DC-SIGN and MR profile. Immunol Cell Biol 88: 716–726. doi:10.1038/icb.2010.22.
27. Nanda SK, Baron J, Royall E, Robinson L, Falciani F, et al. (2009) Infection of bovine dendritic cells by rinderpest or measles viruses induces different changes in host transcription. Virology 395: 223–231. doi:10.1016/j.virol.2009.09.031.
28. Langelaar MFM, Weber CN, Overdijk MB, Müller KE, Koets AP, et al. (2005) Cytokine gene expression profiles of bovine dendritic cells after interaction with Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (M.a.p.), Escherichia coli (E. coli) or recombinant M.a.p. heat shock protein 70. Vet Immunol Immunopathol 107: 153–161. doi:10.1016/j.vetimm.2005.04.009.
29. Wu L, KewalRamani VN (2006) Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. Nat Rev Immunol 6: 859–868. doi:10.1038/nri1960.
30. Huang Q, Liu D, Majewski P, Schulte LC, Korn JM, et al. (2001) The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. Science 294: 870–875. doi:10.1126/science.294.5543.870.
31. Hope JC, Werling D, Collins RA, Mertens B, Howard CJ (2000) Flt-3 ligand, in combination with bovine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-4, promotes the growth of bovine bone marrow derived dendritic cells. Scand J Immunol 51: 60–66.
32. Wu Z, Rothwell L, Young JR, Kaufman J, Butter C, et al. (2010) Generation and characterization of chicken bone marrow-derived dendritic cells. Immunology 129: 133–145. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03129.x.
33. Talmor M, Mirza A, Turley S, Mellman I, Hoffman LA, et al. (1998) Generation or large numbers of immature and mature dendritic cells from rat bone marrow cultures. Eur J Immunol 28: 811–817. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199803)28:03<811::AID-IMMU811>3.0.CO; 2-S.
34. Inaba K, Swiggard WJ, Steinman RM, Romani N, Schuler G, et al. (2009) Isolation of dendritic cells. Curr Protoc Immunol Chapter 3: Unit 3.7. doi:10.1002/0471142735.im0307s86.
35. Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J (2008) Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. Cytokine Growth Factor Rev 19: 41–52. doi:10.1016/j.cytogfr.2007.10.004.
36. Lin L, Ibrahim AS, Xu X, Farber JM, Avanesian V, et al. (2009) Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against Staphylococcus aureus and Candida albicans infection in mice. PLoS Pathog 5: e1000703. doi:10.1371/journal.ppat.1000703.
37. Cho JS, Pietras EM, Garcia NC, Ramos RI, Farzam DM, et al. (2010) IL-17 is essential for host defense against cutaneous Staphylococcus aureus infection in mice. J Clin Invest 120: 1762–1773. doi:10.1172/JCI40891.
38. Jakob T, Walker PS, Krieg AM, Udey MC, Vogel JC (1998) Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. J Immunol 161: 3042–3049.
39. Keating SE, Maloney GM, Moran EM, Bowie AG (2007) IRAK-2 participates in multiple toll-like receptor signaling pathways to NFkappaB via activation of TRAF6 ubiquitination. J Biol Chem 282: 33435–33443. doi:10.1074/jbc.M705266200.
40. Nimura F, Zhang LF, Okuma K, Tanaka R, Sunakawa H, et al. (2006) Cross-linking cell surface chemokine receptors leads to isolation, activation, and differentiation of monocytes into potent dendritic cells. Exp Biol Med (Maywood) 231: 431–443.
41. Rescigno M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P (2000) Molecular events of bacterial-induced maturation of dendritic cells. J Clin Immunol 20: 161–166.
42. Joffre O, Nolte MA, Spörri R, Reis e Sousa C (2009) Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. Immunol Rev 227: 234–247. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00718.x.
43. Jin P, Han TH, Ren J, Saunders S, Wang E, et al. (2010) Molecular signatures of maturing dendritic cells: implications for testing the quality of dendritic cell therapies. J Transl Med 8: 4. doi:10.1186/1479-5876-8-4.
44. Jiang H, van de Ven C, Baxi L, Satwani P, Cairo MS (2009) Differential gene expression signatures of adult peripheral blood vs cord blood monocyte-derived immature and mature dendritic cells. Exp Hematol 37: 1201–1215. doi:10.1016/j.exphem.2009.07.010.
45. Ribeiro OG, Maria DA, Adriouch S, Pechberty S, Cabrera WHK, et al. (2003) Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. J Leukoc Biol 74: 497–506. doi:10.1189/jlb.0103039.
46. Marino S, Myers A, Flynn JL, Kirschner DE (2010) TNF and IL-10 are major factors in modulation of the phagocytic cell environment in lung and lymph node in tuberculosis: a next-generation two-compartmental model. J Theor Biol 265: 586–598. doi:10.1016/j.jtbi.2010.05.012.
47. Sasaki S, Nishikawa S, Miura T, Mizuki M, Yamada K, et al. (2000) Interleukin-4 and interleukin-10 are involved in host resistance to Staphylococcus aureus infection through regulation of gamma interferon. Infect Immun 68: 2424–2430.
48. Miller LS, O'Connell RM, Gutierrez MA, Pietras EM, Shahangian A, et al. (2006) MyD88 mediates neutrophil recruitment initiated by IL-1R but not TLR2 activation in immunity against Staphylococcus aureus. Immunity 24: 79–91. doi:10.1016/j.immuni.2005.11.011.

49. Kusuhai K (2010) [Genetic susceptibility to infectious diseases: immunogenetical approaches to mycobacterial infections and subacute sclerosing panencephalitis]. J UOEH 32: 177–194.
50. Zhang L, Prather D, Vanden Eng J, Crawford S, Kariuki S, et al. (2010) Polymorphisms in genes of interleukin 12 and its receptors and their association with protection against severe malarial anaemia in children in western Kenya. Malar J 9: 87. doi:10.1186/1475-2875-9-87.
51. Katz JB, Muller AJ, Prendergast GC (2008) Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. Immunol Rev 222: 206–221. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00610.x.
52. Liu X, Shin N, Koblish HK, Yang G, Wang Q, et al. (2010) Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. Blood 115: 3520–3530. doi:10.1182/blood-2009-09-246124.
53. Reis ES, Barbuto JAM, Isaac L (2007) Complement components, regulators and receptors are produced by human monocyte-derived dendritic cells. Immunobiology 212: 151–157. doi:10.1016/j.imbio.2006.11.010.
54. Taylor PR, Carugati A, Fadok VA, Cook HT, Andrews M, et al. (2000) A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. J Exp Med 192: 359–366.
55. Castellano G, Woltman AM, Schlagwein N, Xu W, Schena FP, et al. (2007) Immune modulation of human dendritic cells by complement. Eur J Immunol 37: 2803–2811. doi:10.1002/eji.200636845.
56. Medzhitov R (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature 449: 819–826. doi:10.1038/nature06246.
57. Serhan CN, Savill J (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. Nat Immunol 6: 1191–1197. doi:10.1038/ni1276.
58. Torchinsky MB, Garaude J, Martin AP, Blander JM (2009) Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. Nature 458: 78–82. doi:10.1038/nature07781.
59. Kushwah R, Wu J, Oliver JR, Jiang G, Zhang J, et al. (2010) Uptake of apoptotic DC converts immature DC into tolerogenic DC that induce differentiation of Foxp3+ Treg. Eur J Immunol 40: 1022–1035. doi:10.1002/eji.200939782.
60. Cherfils-Vicini J, Vingert B, Varin A, Tartour E, Fridman W, et al. (2008) Characterization of immune functions in TRAF4-deficient mice. Immunology 124: 562–574. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02810.x.
61. Houghton AM, Hartzell WO, Robbins CS, Gomis-Rüth FX, Shapiro SD (2009) Macrophage elastase kills bacteria within murine macrophages. Nature 460: 637–641. doi:10.1038/nature08181.
62. Foulon E, Foucras G (2008) Two populations of ovine bone marrow-derived dendritic cells can be generated with recombinant GM-CSF and separated on CD11b expression. J Immunol Methods 339: 1–10. doi:10.1016/j.jim.2008.07.012.
63. Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol Biol 132: 365–386.
64. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 3: RESEARCH0034.

4 Discussion

L'analyse transcriptomique des CD après stimulation par *S. aureus* inactivé entre les deux lignées divergentes de brebis **a montré des différences d'expression génique par les cellules dendritiques des deux lignées stimulées par des staphylocoques inactivés par la chaleur.**

Tout d'abord, l'étude de la stimulation des CD a montré que celles-ci devenaient plus matures en réponse à la stimulation, qu'elles sécrétaient des cytokines pro-inflammatoires et favorisaient la différenciation des granulocytes/macrophages.

Lors de l'analyse des profils géniques des CD des deux lignées de brebis, le gène TLR2 et sa voie de signalisation n'ont pas été identifiés comme différents. Ainsi la détection de *S. aureus* par ce récepteur ne permet pas d'expliquer les différences observées. Dans l'analyse globale des CD des deux lignées, aucune interleukine, ni molécule CXC n'étaient significativement différentes, mais le récepteur IL12RB était plus exprimé dans les CD des brebis de la lignée résistante et IL1RAP dans celles des brebis de la lignée sensible. Dans les analyses indépendantes de chaque temps de stimulation, nous avons vu qu'avant la stimulation (à T0), l'expression de l'interleukine IL-6 était supérieure chez les brebis de la lignée résistante par rapport à celles de la lignée sensible, alors qu'après 8h de stimulation le rapport était inversé. Ainsi, aucune différence d'expression des cytokines n'a été clairement démontrée entre les CD des deux groupes. L'absence de différence d'expression de CXCL2, IL10 et IL12 semble montrer que, contrairement au modèle souris sur les capacités d'élimination d'une infection à *S. aureus* (Nippe et al. 2011), les brebis de la lignée résistante ne favorisent pas la réponse de type 2, même s'il existe une plus forte tendance à l'expression de l'IL-10 dans ce groupe.

Outre les résultats précédents, l'expression de trois sous-unités du complément (*c1qa, c1qb* et *c1qc*) et de *ido1* est supérieure dans les CD des brebis de la lignée résistante par rapport à celles des brebis de la lignée sensible. Le complément a des activités bactéricides dans le lait (Rainard 2003) et il permet la reconnaissance et l'élimination des corps apoptotiques (Reis et al. 2007; Taylor et al. 2000; Castellano et al. 2007) notamment après la phagocytose. Le C1q a aussi la capacité de réguler le seuil d'activation des CD (Castellano et al. 2007). Le gène *ido1* quant à lui favorise la différenciation des cellules T régulatrices (Katz et al. 2008). Ainsi les activations du complément et d'*ido1* dans les CD des brebis de la lignée résistante permettraient de contrôler l'inflammation en limitant l'activation de la réponse immunitaire.

Les gènes *il1rap* et *myd88* sont plus exprimés dans les CD des brebis de la lignée sensible, or il a été montré chez la souris que, sous forme de dimère dans le complexe IL1R/Myd88, ces éléments participent au recrutement des neutrophiles et à l'élimination d'une infection à *Staphylococcus* (Miller et al. 2006).

L'expression du gène codant pour la métalloprotéinase *mmp12* (aussi appelé *macrophage elastase*) est supérieure dans les CD des brebis de la lignée résistante que dans celles des brebis de la lignée sensible. MMP12 est stocké dans les vésicules de phagocytose des macrophages et a la capacité d'adhérer à la paroi cellulaire des bactéries et de perturber la membrane jusqu'à provoquer la mort de la bactérie (Houghton et al. 2009). Au contraire l'expression du gène *mmp9* (aussi appelé *gelatinase B*) était supérieure chez les CD des brebis de la lignée sensible, mais le rôle de cette metalloprotéinase dans les infections n'est pas connu.

De plus, l'expression de deux gènes codant pour les claudines (*cldn4* et *cldn5*) et un gène codant pour les motifs tri-partites (*trim2*) est supérieure chez les CD des brebis de la

lignée résistante alors que celle de *cldn1* est inférieure après 3h d'exposition à *S. aureus* tué par la chaleur et celle de *trim39 et trim45* est inférieure sur l'ensemble des données. Les claudines sont des protéines membranaires qui jouent un rôle dans les jonctions serrées entre cellules (Elkouby-Naor et Ben-Yosef 2010), il a été montré que CLDN4 était présente lors de l'endocytose de *S. aureus* (Clark et al. 2009), mais leur rôle en réponse à une infection mammaire n'est pas clairement établi. Les motifs tri-partites sont présents dans le cytoplasme et possèdent trois domaines de fixation du zinc. Le rôle de TRIM2 n'est pas connu, il semblerait que TRIM39 facilite l'apoptose par stabilisation de MOAP1 (Lee et al. 2009) et que TRIM45 soit un répresseur transcriptionnel de MAPK (Wang et al. 2004).

En outre, le gène *traf4* est plus exprimé dans les CD des brebis de la lignée résistante, contrairement aux autres gènes de la famille des TNF (tumor necrosis factor) receptor associated factor le seul rôle connu de TRAF4 dans l'immunité est qu'il facilite la migration des cellules dendritiques (Cherfils-Vicini et al. 2008). Au contraire, huit gènes impliqués dans la migration des leucocytes à travers la barrière épithéliale étaient plus exprimés dans les CD des brebis de la lignée sensible que des brebis de la lignée résistante. Ainsi l'interprétation de l'expression des gènes des CD pouvant favoriser la migration des neutrophiles est complexe et difficilement interprétable.

En résumé, les capacités de détection des agents pathogènes *via* la voie de TLR2 et les profils des cytokines canoniques ne sont pas différents dans les cellules dendritiques des brebis de la lignée résistante et de la lignée sensible. En revanche l'activation de la voie du complément est supérieure dans les cellules dendritiques des brebis de la lignée résistante et il semble que le contrôle de l'inflammation *via* IDO1 et la différenciation des cellules T régulatrices soient mieux exprimés dans les cellules dendritiques des brebis de la lignée résistante.

PARTIE 3 : CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES ET RESISTANCE AUX MAMMITES : ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE APRES INFECTION EXPERIMENTALE *IN VITRO* PAR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* OU STIMULATION PAR SON SURNAGEANT DE CULTURE

1 Contexte et objectifs

Dans les chapitres précédents, nous avons examiné les profils géniques de cellules immunitaires. Même si les CEM ne sont pas considérées comme des cellules à compétence immunitaire, il est indéniable qu'elles jouent un rôle important dans le déclenchement de la réponse immunitaire grâce à la production d'un certain nombre de médiateurs. Elles tapissent entièrement la paroi interne du trayon, des canaux galactophores et des alvéoles mammaires (Korhonen et al. 2000). Elles sont ainsi en première ligne lorsque les agents pathogènes pénètrent par le canal du trayon dans la glande. Elles ont un rôle à la fois de barrière car elles empêchent les bactéries de passer plus profondément dans le stroma ; elles peuvent aussi jouer un rôle de sentinelles car elles ont la capacité de sécréter certaines cytokines dans le milieu intérieur, notamment l'interleukine 8 (IL-8, CXCL8), qui recrute les neutrophiles circulant vers la zone d'infection. Elles peuvent également activer directement les cellules dendritiques (Hammad et Lambrecht 2011) résidentes dans le tissu mammaire.

Aussi, de nombreuses études sur la réponse de l'organisme aux agents pathogènes des mammites ont utilisé les CEM comme modèle cellulaire car elles peuvent être prélevées et cultivées *in vitro* assez facilement (Boudjellab et al. 2000; Bougarn et al. 2010; Griesbeck-Zilch et al. 2008; Gunther et al. 2009; Lahouassa et al. 2007; Pareek et al. 2005; Rainard et al.. 2008; Swanson et al. 2009; Weber et al. 2006).

Ainsi pour compléter l'inventaire des types cellulaires évalués dans les études comparatives des brebis de la lignée résistante et des brebis de la lignée sensible aux mammites, nous avons décidé d'inclure les **cellules épithéliales mammaires** afin i) **d'analyser leur réponse à une infection par *Staphylococcus aureus* ou ses produits de sécrétion présents dans le milieu de culture et ii) d'identifier les différences d'expression entre les deux lignées à la suite de ces stimulations**.

Pour cela, des CEM ont été isolées à partir du tissu mammaire de brebis des deux groupes en lactation, puis cultivées *in vitro* et infectées par *S.* aureus ou stimulées par son surnageant de culture.

2 Résumé

Les CEM ont été isolées du tissu mammaire de six brebis de la lignée résistante et six brebis de la lignée sensible au début de leur première lactation. Les cellules épithéliales mammaires (CEM) des douze brebis ont été isolées et cultivées *in vitro* jusqu'à la confluence (Lahouassa et al. 2007). Cinq modalités de stimulation ont été examinées : la première n'a fait l'objet d'aucune stimulation et a été prélevée après 1h de culture (Tref) par rapport au début de l'essai ; deux autres ont été stimulés par *S. aureus* vivant (*Sa*) après 1 et 5 heures respectivement alors que les deux autres ont été stimulés par le surnageant de culture (*Sp*) pour les mêmes durées. Les échantillons seront ainsi désignés selon la durée de la stimulation

(1 ou 5h d'exposition) et la nature du stimulus (les bactéries, *Sa* ou le surnageant, *Sp*) : T1Sa, T5Sa, T1Sp et T5Sp.

Dans les CEM stimulées par *Sa* vivant, 531 gènes avaient une expression qui variait au cours du temps (p-value corrigée par la procédure de Benjamini-Hochberg < 0.01 et fold-change > 1.5) contre 687 après stimulation par le surnageant de culture. La voie de signalisation de IGF1 et la régulation des points de contrôle des dommages de l'ADN ont été modifiées par la co-culture avec *Sa*, et les voies de signalisation des interleukines, des TLR, de CD40, des TNFR1 et 2, de NFκB et de l'apoptose stimulée par MYC ont été modifiées par l'ajout de surnageant. De plus, seulement 13% des gènes de CEM sont activés dans le temps après contact avec *Sa*, alors que 59 % le sont avec le surnageant ; de même, 68% sont réprimés avec *Sa* contre 30% avec *Sp*. L'expression des autres gènes différentiels fluctue au cours du temps, ainsi le maximum ou le minimum d'expression est atteint après 1h. Environ la moitié des gènes différentiels (n=286) sont communs aux deux stimulations. Ensuite, ces listes de gènes ont été organisées en clusters qui regroupent des gènes dont l'expression est très similaire au cours du temps. Brièvement, les gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et les processus cataboliques étaient réprimés dans les CEM pour les deux stimulations, alors que les gènes des processus métaboliques étaient activés. Les voies de l'apoptose étaient fortement modifiées par la stimulation bactérienne, car de nombreux gènes réprimés ou activés étaient impliqués dans la régulation de cette voie. Des gènes impliqués dans la réponse cellulaire au stress étaient plutôt réprimés après stimulation par la bactérie vivante, et plutôt activés après stimulation par le surnageant de culture. Enfin des gènes impliqués dans la réponse immunitaire et notamment dans la régulation de la chimiotaxie étaient activés dans les CEM en présence de *Sa*.

La comparaison des profils d'expression des CEM entre les deux lignées de brebis a montré que 20 gènes seulement étaient différemment exprimés entre les lignées, avec seulement trois gènes plus fortement exprimés dans les CEM des brebis de la lignée résistante (*cat, plet1* et *ppa1*). Une analyse fonctionnelle des 20 gènes différentiels montre que 15 d'entre eux peuvent être regroupés au sein d'un même réseau, dont la principale fonction est la régulation de l'inflammation. De plus, une comparaison entre lignées effectuée au sein de chacune des 5 conditions de temps et de stimulations a permis d'apporter quelques éléments complémentaires : un plus grand nombre de gènes différentiels entre lignées a été observé après 5h (n=17) qu'après 1h (n=11) d'exposition des CEM à *Sp,* et une sous-unité non classique du CMH de classe 1 était plus exprimée dans les CEM des brebis de la lignée résistante que dans celles des brebis de la lignée sensible dans les conditions Tref, T1Sa et T5Sa.

3 Article 3

Genetic susceptibility to *Staphylococcus aureus* mastitis in sheep: transcriptional profiling of mammary epithelial cells in response to living cells or culture supernatant

Bonnefont CMD, Rainard P, Cunha P, Gilbert F, Toufeer M, Aurel MR, Rupp R, Foucras G

Soumis le 18 juillet 2011 à Physiological Genomics

Refusé

Puis re-soumis le 25 octobre 2011 à Physiological Genomics

Retour avec des corrections à effectuer le 17 novembre 2011

Genetic susceptibility to *S. aureus* mastitis in sheep: *differential expression* of mammary epithelial cells in response to live bacteria or supernatant

Cécile MD Bonnefont[1,2,3], Pascal Rainard[4], Patricia Cunha[4], Florence Gilbert[4], Mehdi Toufeer[2,3,] Marie-Rose Aurel[5], Rachel Rupp[1], and Gilles Foucras[1,2]

[1] INRA, UR631, SAGA, F-31326 Castanet-Tolosan, France

[2] INRA, UMR1225, IHAP, F-31076 Toulouse, France

[4] INRA, UR1282, IASP, F-37380, Nouzilly, France

[5] INRA, UE321, Domaine expérimental de la Fage, F-12250, Roquefort, France

CMDB: cecile.bonnefont@toulouse.inra.fr

PR: pascal.rainard@tours.inra.fr

PC: patricia.cunha@tours.inra.fr

FG: florence.gilbert@tours.inra.fr

MT: m.toufeer@envt.fr

MRA: marie-rose.aurel@toulouse.inra.fr

RR: rachel.rupp@toulouse.inra.fr

GF: g.foucras@envt.fr

Running title

Epithelial transcriptome in mastitis resistant and susceptible sheep

Contact information

Address for reprint requests and other correspondence: G. Foucras, UMR1225 INRA-INP-ENVT, IHAP, 23 chemin des capelles, 31076 Toulouse cedex 03, France, (E-mail: g.foucras@envt.fr). Tel: +33 561 193 902, fax: +33 561 193 834.

Abstract

Staphylococcus aureus is a prevalent pathogen for mastitis in dairy ruminants, and is responsible for both clinical and subclinical mastitis. Mammary epithelial cells (MEC) represent not only a physical barrier against bacterial invasion, but are also active players of the innate immune response permitting infection clearance. To decipher their functions in general and in animals showing different levels of genetic predisposition to *Staphylococcus* in particular, MEC from ewes issued from a divergent selection on milk somatic cell count were stimulated by *S. aureus*. MEC response was also studied in function of the stimulation condition with live bacteria or culture supernatant. The early MEC response was studied during a five-hour time course by microarray to identify differentially expressed genes with regard to the host genetic background and in function of the conditions of stimulation.

In both conditions of stimulation, metabolic processes were altered, the apoptosis-associated pathways were considerably modified, and inflammatory and immune responses were enhanced with the up-regulation of *il1a*, *il1b* and *tnfa* and several chemokines known to enhance neutrophil (*cxcl8, cxcl3*) or mononuclear leukocyte (*ccl20*) recruitment. Genes associated with oxidative stress were increased after live bacteria stimulation whereas immune response-related genes were higher after supernatant stimulation in the early phase. Only twenty-three genes were differentially expressed between resistant and susceptible animals without any clearly defined role on the control of infection. To conclude, this suggests that MEC may not represent the cell type at the origin of the difference of mastitis susceptibility, at least as demonstrated in our genetic model. Supernatant or heat-killed *S. aureus* produce biological effects that are essentially different from those induced by live bacteria.

Keywords:

Mammary epithelial cell, *S. aureus*, mastitis, genetic predisposition, microarray

Abbreviations:

DC: dendritic cell

DEG: differentially expressed gene

IMI: intramammary infection

MEC: mammary epithelial cell

MSC: milk somatic cell

PI: post infection

PS: post stimulation

Sa: live *Staphylococcus aureus*

SCC: somatic cell count

SCS: somatic cell score

Sp: *Staphylococcus aureus* culture supernatant

Introduction

Mastitis is considered the most costly disease of dairy cattle (4, 18, 63) and sheep (6). Infections are associated with huge changes in the defence system of the mammary gland (52) and cause a reduction in milk yield (63) and quality (6). Amongst mammary pathogens, *Staphylococci,* particularly *S. aureus,* are the most prevalent bacteria for intramammary infections (IMI) in small ruminants (6); they often lead to chronic infections and a strong increase in the somatic cell count (SCC) (53). After infection, somatic cells, mainly polymorphonuclear neutrophils (38, 47, 55) are recruited to the mammary gland through the local synthesis of chemokines such as interleukin 8 (IL-8, CXCL8) (37). MEC line the lumen of the mammary gland and represent the first and most abundant cell type in contact with invading bacteria and their secreted products (29). MEC has the ability to synthesize CXCL8 *in vitro* (26). MEC may contribute actively to the early immune and inflammatory responses of the mammary gland via the synthesis of proinflammatory cytokines and then by promoting neutrophil recruitment (27, 31, 32, 37, 45).

S. aureus IMI have already been studied in small ruminants (8, 41), The complexity of the mammary defence and the dynamic crosstalk between host cells and the pathogen (2) make the study of mastitis particularly difficult. To offset part of these issues, *in vitro* models of MEC cultures have been largely used to study the interaction of *Escherichia coli* or *S. aureus* with the host cells (11, 24, 27, 31, 54, 62). Although the interaction of MEC with live bacteria has already been studied in several reports (31, 33, 36), heat-killed bacteria (24–27), and pathogen-associated molecular patterns (PAMP) such as lipopolysaccharide (LPS) for *E. coli* or lipoteichoic acid (LTA) for *S. aureus* (1, 11, 13, 32, 39, 43, 62), or supernatant (Sp) (36) are more commonly used. The recourse to synthetic or inert stimuli avoids bacterial development in the culture medium, and ensuing consumption of nutrients by the bacteria or release of high toxic compounds. However, they do not cover the full array of bacteria-cell interactions, and the difference between both types of stimulus is poorly known (36).

At the host level, mastitis outcomes depend not only on the virulence of the bacteria, but also on the strength and timely development of the host's defences. Thus, genetic improvement is considered to be an interesting option of diminishing mastitis frequency. In this context, we have developed a divergent selection protocol of Lacaune dairy sheep based on somatic cell score (SCS) extreme breeding values (49). Staphylococcal IMI and abscess development were more frequent in high SCS animals than in low SCS animals (49, 8) and bacterial count after experimental infection with *S. aureus* was significantly lower in the low SCS animals (8). Therefore, high SCS animals were associated with higher susceptibility to mastitis. Up to day, two experiments were performed on these sheep lines to investigate associated gene mechanisms that operate in response to *Staphylococcus* infection in animals with a different degree of susceptibility. After intramammary inoculations of *S. epidermidis* or *S. aureus*, milk somatic cells (MSC) were collected for transcriptomic analysis (8). In vitro,

dendritic cells (DC) were also analyzed after stimulation by *S. aureus* to describe gene reprogramming in cells of the monocytic lineage (58).

Until now, very few works have addressed the question of mastitis resistance and measurement of gene expression in ruminants. Recently, another group has established two models in dairy cattle to address the same question. In the first approach, cows were chosen according to extreme breeding values for SCS (25) and in the second one, a QTL localised on BTA18 was used to distinguish two groups of cattle on their susceptibility to mastitis (14, 25, 30). MEC of cows with resistant or susceptible alleles at the BTA18 QTL were examined *in vitro* after they were stimulated by either heat-killed *S. aureus* or *E. coli* over a period of 24hrs (14).

Thus, the model of divergent sheep lines represents an interesting opportunity to examine the response of MEC to *Staphylococcus* infection in relation to genetic predisposition to mastitis. Therefore, MEC were isolated from ewes in the two divergent lines and were stimulated in vitro with *S. aureus* to compare their response. We evaluated the MEC response to two different kinds of stimuli, either live bacteria or their soluble factors that are present within the culture supernatant. To look into the network of genes that coordinate the early immune and inflammatory response of MEC upon interaction with live *S. aureus* or its culture supernatant, gene expression profiling was done using an ovine-specific microarray.

Material and Methods

Animals and sample collection

Mammary epithelial cells (MEC) were obtained from primiparous dairy ewes at onset of lactation. The animal model has been previously described (49). Briefly, animals were from a divergent selection of French Lacaune ewes based on extreme breeding values for the SCS. Previous studies indicated that the low SCS ewes (designated in this paper as "resistant") are characterized by enhanced mastitis resistance when compared to the high SCS ewes (designated as "susceptible") (49) and show a lower frequency of infection in natural conditions (49) and a lower bacteriological count after experimental infection (8). Here, two groups of six ewes with no parental links were chosen from the resistant and susceptible lines. Mammary parenchyma was collected after the ewes had been slaughtered.

Isolation and culture of ovine MEC

Mammary tissue was obtained upon slaughter. The ewes were sacrificed in the Institute's slaughterhouse as per established standards and in compliance with the policies of INRA's Animal Care Committee. Ovine MEC were isolated from mammary secretory tissue as previously described for bovine MEC (31). After one passage, cell cultures that displayed the typical cobblestone morphology at confluence (Additional File 1) were cryopreserved in liquid nitrogen. Then they were expanded and prepared for stimulation as described (12) and were used at their third passage. After thawing, MEC were multiplied in growth medium comprising Advanced DMEM/F12 medium (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) which contains albumin (0.4 mg/ml), supplemented with 2 mM L-glutamine, 10 ng/ml IGF-1

(Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), 5 ng/ml fibroblast growth factor (Peprotech), 5 ng/ml human recombinant epidermal growth factor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1 µg/ml hydrocortisone (Sigma), and 20 mM HEPES (Cambrex Biowhittaker, East Rutherford, NJ, USA). Cells were seeded in 6-well tissue culture plates (5 x 10^5 cells/well) and cultured until confluence. Then the growth medium was replaced with stimulation medium composed of Advanced DMEM/F12 medium with 2mM L-glutamine, 20 mM HEPES, and 4 ng/ml hydrocortisone as additives 18 hours before stimulation.

Bacterial strain, culture conditions and stimulation of ovine MEC

The *S. aureus* strain Sa9A was isolated from the milk of a mastitic ewe. The isolate was typed by PCR and shown to be of the agr2 group (23) and to possess the genes for the hemolysins hla and hlb, and for the leukotoxins lukE/D and LukM/F' but not for the Panton-Valentine leucocidin. It produced a supernatant after overnight culture in Brain Heart Infusion broth with a cytotoxic titer of 80 to bovine neutrophils (moderate activity), determined as described previously (42).

For the preparation of bacterial culture supernatant, Sa9A bacteria were cultured for 7 hours in Advanced DMEM/F12 medium. When the culture was discontinued, the optical density at 660 nm was 0.513, approximately half of the OD value reached at the stationary phase. Following centrifugation at 4000 x *g* for 20 min at 4°C, the supernatant was sterile filtered (0.2 µm) and stored in aliquots at -70°C. Live bacteria were grown overnight in Advanced DMEM/F12, washed once in Dulbeccos's phosphate buffered saline and adjusted to the concentration of 3 x 10^5 cfu/ml in Advanced DMEM/F12 by reference to the absorbance value at 660 nm and with retrospective checking by means of cfu plate assays.

For the stimulation experiments, ovine MEC were incubated with either live bacteria (Sa samples) or bacterial supernatant (Sp samples) for 1 (T1 samples) or 5 (T5 samples) hours. Just before stimulation, the medium was removed from the confluent epithelial monolayers and replaced with fresh medium plus stimulus. The final concentration of bacteria was 3 x 10^5 cfu/ml, *i.e.* equivalent to an initial multiplicity of infection of 1 cfu per cell. The final concentration of the bacterial supernatant was 20% in Advanced DMEM/F12 during incubation with MEC. After 1 h and 5 h of incubation, the cell culture medium was pipetted out, sterile filtered and stored at -70°C. The monolayers were washed twice with HBSS, and cells were harvested for RNA extraction. The control cell culture consisted of MEC which received fresh culture medium at time 0 and were harvested 1 h later (Tref samples), at the same time as cells which had been incubated for 1 h with live Sa9A or bacterial supernatant.

Quantification of CXCL8 and CXCL3 by ELISA

The sandwich ELISA for CXCL3 (previously known as GROγ), the "constitutive/inducible" chemokine in milk of dairy ruminants, was carried out as previously described (44). Cell culture supernatants were tested undiluted. Concentrations of the chemokine CXCL8 were determined as for CXCL3 except that commercial antibodies were used to set up the sandwich ELISA. Microtiter plates (96-well; Nunc™ Immunoplate Maxisorp) were coated with a monoclonal antibody (clone 8M6; MCA1660, Serotec, Osford, UK) at the concentration of 2 µg/ml in Na carbonate/bicarbonate buffer 0.1 M pH 9.6 overnight at 4°C. After blocking the plates with phosphate buffered saline (PBSG) supplemented with 0.5% (w/v) gelatin (Gibco), samples diluted 2 to 10 fold in PBSG were incubated for 2 h at 37°C. Recombinant bovine CXCL8 (44) was used to establish a standard

curve. Rabbit anti-ovine CXCL8 (AHP425; Serotec) diluted 1/2000 in PBSG was used as the detection antibody. After an 1-h incubation at 37°C and washes, anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate (Jackson Immunoresearch) diluted 1/20000 in PBSG was incubated for 30 min at 37°C. Finally, the ELISA was revealed by incubation with TMB ELISA substrate (Uptima, Interchim, Montluçon, France). After addition of stop solution, optical density was read at 450 nm with a plate reader (Multiskan RC, Labsystems, Helsinki, Finland).

Microarray analysis

RNA extraction, amplification, labelling and RNA quality

Total RNA was extracted by a double extraction method using first Trizol (Invitrogen) and then RNeasy columns (Qiagen). Quantification was performed using a spectrophotometer (NanoDrop Technologies) and RNA quality was assessed using an Agilent Bioanalyzer 2100. The RNA Integrity Number (RIN) index was 8.6 ± 1.4 (m ± sd). Two hundred ng of RNA were converted into double-stranded cDNA and amplified with the Quick Amp Labelling kit, two colors (Ref : 5190-0424, Agilent Technologies®) and RNA was then labelled with Cy3 and Cy5.

Hybridization, scanning and raw data storage

Sixty microarrays were hybridized using the ovine oligonucleotide slide (ref 019921, Agilent Technologies®) in a two-colour dye-swap experimental design. On each microarray, two samples from the same experimental condition, one from a resistant ewe and the other from a susceptible ewe were hybridized simultaneously (Additional File 2). Chips were hybridized at 65°C for 17 h and then washed according to the manufacturer's protocol. Intensity values were recorded with a 4000B Axon scanner. Two channel images were imported into the Agilent's Feature Extraction software for spot finding and alignment. One microarray was removed from the analysis due to poor hybridization quality.

Only 8,547 genes among the 15,008 different probes that are present on the ovine oligoarray, were annotated with the Human ortholog Gene Nomenclature Committee (HGNC) (http://www.sigenae.org/, sheep oligo annotation version 7 of 2011/03/02) (16). We obtained additional information on un-annotated probes using the Basic Local Alignment Search Tool programme on the NCBI website (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) and using the ENSEMBL website (http://www.ensembl.org/index.html).

Statistical analysis of microarray data

Raw data from Agilent's Feature Extraction were imported in R (version 2.9.0) through the LIMMA package (51). For each sample, probes were flagged if their intensity was of good quality, unsaturated and uniform. Flagged probes were conserved for further analysis. A total of 4,225 out of 15,008 probes were retained. Previously, the same probe filter was performed on other datasets and it enabled to retain much more genes in other cell types like DC and MSC. Lowess normalization without background correction was applied to raw intensity data to correct the dye effect. Then T-quantile normalization was applied considering the five class-conditions (Tref, T1Sa, T5Sa, T1Sp and T5Sp) to correct the array effect. A $\log_2$ transformation of data was applied and then pre-processed data were imported in SAS (version 9.1). The $\log_2$-intensity of each dye was analyzed separately, since Bossers *et al.*

showed that this method enhanced the reproducibility and the sensitivity of the detection of differentially expressed gene (DEG) analysis when compared to ratio-based analysis (9). Differences of expression in MEC were analyzed probe by probe by an analysis of variance using the SAS MIXED procedure. First, MEC responses to infection were studied separately in the "live bacteria" condition (Tref, T1Sa, T5Sa) designed by Sa or "supernatant" condition (Tref, T1Sp, T5Sp) designed by Sp using an ANOVA model including the time effect (M1.1). Then stimulation forms were compared within time effect; an ANOVA was performed with T1 and T5 data to analyse T1Sa vs T1Sp and T5Sa vs T5Sp (M1.2). Finally, the differences between resistant and susceptible animals were analyzed using two models; the first model (M2.1) included a global line effect, a time*stimulation effect and the color effect; in the second model (M2.2) the line effect was fitted within the time*simulation condition:

$$\mathbf{M1.1:}\ \log_2(i_{norm}) = \mu + \mathbf{Time} + \mathbf{Color}$$

$$\mathbf{M1.2:}\ \log_2(i_{norm}) = \mu + \mathbf{Stimulus(Time)} + \mathbf{Color}$$

$$\mathbf{M2.1:}\ \log_2(i_{norm}) = \mu + \mathbf{Line} + \mathbf{TimeStim} + \mathbf{Color}$$

$$\mathbf{M2.2:}\ \log_2(i_{norm}) = \mu + \mathbf{TimeStim} + \mathbf{Line(TimeStim)} + \mathbf{Color}$$

$\mathrm{Log}_2(i_{norm})$ was the normalized intensity of a probe; Time was either Tref, T1Sa and T5Sa or Tref, T1Sp and T5Sp, Stimululus was Sa or Sp, Line was resistant or susceptible, TimeStim represented the 5 conditions: Tref, T1Sa, T5Sa, T1Sp and T5Sp and Color stood for the dyed label: Cy3 or Cy5.

All p-values were corrected with the Benjamini-Hochberg FDR procedure (40). Fold-changes (FC) were computed as the ratio of the ANOVA-estimated-$\log_2$-intensity of samples from two conditions. For the time analysis, the numerator was the latest time and the denominator the earliest time, so a positive FC meant an up-regulation during the time-course. For the stimulation analysis, the numerator was Sa and the denominator Sp. For the line effect analysis, the numerator was the resistant ewes and the denominator, the susceptible ewes. Probes were declared to be differentially expressed if their corrected p-values were below the threshold of 0.05 and if their absolute FC was superior to 0.585, which corresponds to a minimal 1.5-fold increase in gene expression in one of the conditions.

Furthermore, as few DEG between resistant and susceptible animals were identified, gene set enrichment analysis (GSEA) was performed. It was based on the list of genes found in the ANOVA (Model 2.1) with a Benjamini-Hochberg corrected p-value inferior to 0.05 (n = 596 probes, with 537 HGNC annotated genes). Gene sets with at least 15 genes were retained for analysis. The p-value was calculated by computing the enrichment score in 1,000 phenotype permutations. Gene sets with a p-value inferior to 0.05 were declared as significantly enriched.

The experiment was deposited in GEO at the identifier number GSE30390 (BioArray Software Environment - version SIGENAE).

Biological interpretation of the focus genes

Two hierarchical clustering of the DEG in the time course based on the Pearson-centred distance metric and centroid linkage rule were performed with GeneSpring®. Samples were averaged to present mean values for Tref, T1 and T5. Using the heatmap, genes

were sorted into clusters that showed different time profiles and these clusters were interpreted with the available biological information.

Canonical pathway analysis was performed using Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com). Canonical pathways analysis identified the pathways from the IPA library of canonical pathways that were most significant to the data set. DEG associated with a canonical pathway in Ingenuity's Knowledge Base were considered for the analysis. As all spots of the Agilent microarray were not annotated, the whole slide cannot be used as a reference database for the canonical or function analysis. Human databases were used as references. The significance of the association between the data set and the canonical pathways was measured in two ways: i) a ratio of the number of molecules from the data set that mapped to the pathway over the total number of molecules that map to the canonical pathway; and ii) Fisher's exact test was used to calculate a p-value determining the probability that the association between the genes in the dataset and the canonical pathway could be explained by chance alone. Only the canonical pathways with a ratio superior to 10% and a p-value inferior to 0.05 were presented in this paper. About network analysis a score is calculated for the significance of the network. The higer the score is, the more significant it is.

Gene Ontology analyses were performed using DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (http://david.abcc.ncifcrf.gov/). The singular enrichment analysis and the modular enrichment analysis tested the enrichment of each annotation term in a linear model and led to establishing relationships between genes with similar biological functions. Thereafter, we considered that a gene list was enriched for an annotation term if this term was represented by at least three genes and had an EASE Score inferior to 0.05. The gene lists and the biological functions of the DEG in the time course after stimulation by Sa or Sp were compared by generating Venn diagrams. To further interpret these data, the sense of the regulation (up or down) was considered.

Overrepresented transcription factors that are known to bind to the promoter regions of the listed focus genes were identified with InnateDB (http://www.innatedb.com). This analysis was performed to all DEG during the time course following stimulation by Sa or Sp. First, two lists were created by pooling the genes from the down-regulated (C0 and C1 from Sa experiment, and CA and CD from Sp experiment) and up-regulated (C4 and C5 from *Sa* experiment, and CB and CC from *Sp* experiment) clusters. Then the genes were annotated by ENSEMBL and the files with p-values and annotations were imported in InnateDB. The hypergeometric algorithm was applied to the data and the p-values were corrected by Benjamini-Hochberg at 5%.

Reverse transcription

cDNA was generated from 300ng of total RNA using the Superscript III First Strand Synthesis System Kit (Invitrogen) and random hexamer primers, and following the manufacturer's instructions. The relative mRNA expression levels were verified for Tref, T5Sa, T1Sp and T5Sp samples. The gene expression of T1Sa samples was measured only for *cxcl3* and *cxcl8*; for the other genes it was not measured because too few differences were observed when compared with the Tref samples after microarray analysis.

For quantification of mRNA transcripts, primer pairs were designed using Primer3 (48) based on the relevant ovine mRNA sequences and synthesized commercially (Eurogentec). The specificity of designed primers was checked with BLAST

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) and Primer Express® v2.0. For some genes for which ovine sequence was not available, a comparative gene alignment of bovine, human, rat and mouse sequences was performed, and primers were then designed on the most conserved regions between these species. Optimal annealing temperatures were determined for each primer pair, and the primers were checked for the absence of primer dimers and efficiency before use. The primers used in RT-qPCR experiments are listed in Table 1.

RT-qPCR was performed following two different protocols depending on the number of genes to be tested. When measuring expression of a small number of genes, an Applied Biosystems 7300 Real time PCR system was used. All assays were carried out in duplicate and each reaction contained 5 µl of diluted cDNA with 2.5 µl (0.5 µM) of each forward and reverse primer along with 12.5 µl of Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

The high-throughput microfluidic BioMark™ qPCR platform (Fluidigm) was used for qPCR analysis running the 48.48 dynamic array. Methods were essentially as described before (57). Briefly, cDNA from all samples was pre-amplified using a pool of forward and reverse primers. After priming the empty dynamic array, 5 µl of sample reaction mixtures were then loaded into the sample wells carefully avoiding any bubbles, 5 µl of primer reaction mixtures were loaded into the assay wells and the NanoFlex™ 4-IFC Controller was used for loading and mixing. The loaded dynamic array was then transferred onto the BioMark™ HD system. For both approaches, the qPCR cycling program was 10 min at 95 °C for activation of the hot-start enzyme, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 1 min, and elongation at 72 °C for 20 s. Melting curve analysis was performed after completion of the qPCR by collecting fluorescence intensities between 60 and 95 °C.

RT-qPCR data analysis and normalization

The stability of six house keeping genes (*gapdh, hprt, rp19, rp26, sdh* and *tyr)*, previously mentioned in the literature, was checked in our 48 samples and data obtained was analyzed by GeNorm (http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/) (59), a software package freely available for research use. Hence, RT-qPCR data were normalized against the four most stable genes (*rp19*, *rp26, tyr* and *gapdh*) as determined by GeNorm analysis. Specific amplification of each targeted cDNA was confirmed by melt curve analysis. Measured Ct values were exported from the BioMark™ software to Excel for data analysis. qPCR technical replicates of samples were averaged and expression ratios were calculated by the delta delta Ct method normalized to the multiple housekeeping genes (59) tests with the NPAR1WAY procedure of SAS® (v.9.1). The values were expressed as a ratio of the sample with the reference made of susceptible animal samples at Tref.

Results

1- MEC response to *Staphylococcal* stimulations

MEC were cultivated *in vitro* and stimulated with Sa or Sp. MEC were collected without any stimulation (Tref) or at 1 or 5 hours post-stimulation (T1, T5). To ascertain that MEC responded to the stimulations, the expressions of five genes were measured by RT-qPCR (*ccl20, cxcl3, cxcl8, il1b* and *tnfa*) at Tref and T5 (Figure 1). The genes *cxcl8, ccl20,*

il1b and *tnfa* were significantly up-regulated at T5 with both Sa and Sp (p-value < 0.01, except for *il1b* p-value < 0.05). The amplitude of gene expression was weak for *il1b* with a FC between T5Sa vs Tref and T5Sp vs Tref near to 2, whereas it was high for *ccl20* and *tnfa* after Sa stimulation with a FC (T5Sa vs Tref) around 15 and 100, respectively. Neither comparison (between lines or stimulations) was significantly different. Expression of CXCL3 and CXCL8 was also confirmed by ELISA at the protein level after 5 hours of stimulation (data not shown).

1-1 MEC stimulation with live bacteria

When stimulated with Sa, a total of 531 probes, corresponding to 378 genes, were differentially expressed in MEC during the time course (Model M1.1, Additional file 3). The expression of four down-regulated genes (*ctgf, cyr61, egr1* and *myc*) and seven up-regulated genes (*ddit4, il-1a, cxcl8, nfil3, saa3, slc2a3* and *vegfa*) was measured by RT-qPCR. The expression changes of these 11 genes were indeed confirmed (p<0.015) (Table 2). For the global gene list obtained from the microarray analysis, the canonical pathways "IGF1 signaling" (p<0.001, with the genes *ywhaq, pxn, ctgf, ywhab, csnk2a1, igfbp3, rac1, prkaca, pik3r2* and *cyr61*) and "DNA damage checkpoint regulation pathways" (p<0.001, with the genes *ywhab, ywhaq, cks2, , ccnb3, cdkn1a, mdm2*) belonged to the list of pathways that were significantly affected after Sa stimulation.

Furthermore, hierarchical clustering of the DEG with time produced six clusters (Figure 2A). First, the expression of 361 probes was down-regulated in the time course (clusters 0 and 1). A first cluster of 154 probes (cluster 0) showed no change in expression levels between Tref and 1hr of stimulation and then a diminution between 1 and 5hrs. The GO analysis of the cluster 0 revealed an enrichment in genes involved in the regulation of cell cycle ("Cell cycle", "Cell Cycle process", "Regulation of cell growth", "Mitosis"…, p<0.001), induction of apoptosis ("Apoptosis", "Programmed cell death", "Regulation of of apoptosis" …, p=0.003), catabolic processes ("Regulation of caspase activity" p=0.023, "Regulation of macromolecule metabolic process" p=0.025, "Cyclin catabolic process" p=0.030…) and the "p53 signalling pathway" (p=0.002). The expression of 207 probes (cluster 1) dropped after the stimulation; the GO analysis of this cluster showed that whereas a few of these genes were involved in cell growth ("Regulation of growth" p=0.011, "Cell cycle process" p=0.018…) or in "Regulation of apoptosis" (p=0.006), most of them were involved in response to stress ("Cellular response to stress" p=0.019, "Cellular response to oxidative stress" p=0.031…), in development ("Muscle and tissue development" p<0.001, "Tissus morphogenesis" p<0.001, "Morphogenesis of an epithelial sheet" p=0.002) and in regulation of biosynthetic process (p=0.008). A third cluster of 67 probes (cluster 2) comprised the genes that were the most expressed at T1 after which their expression came back to the previous levels at T5 (Figure 2A). The GO analysis of the cluster 2 showed enrichment in genes involved in cell cycle ("Cell cycle" p<0.001, "Positive regulation of cell cycle" p=0.014, "Mitosis" p=0.034…) and in cellular respiration ("Cellular respiration" p=0.040, "Electron transport chain" p=0.006, "ATP synthesis coupled electron transport" p=0.014…). Another group of 33 probes were on the contrary down-regulated at T1, whereas their expression was higher at T5 (cluster 3, Figure 2A), and were involved in the "Negative regulation of molecular function" (p=0.018) and in the "Regulation of apoptosis" (p=0.044). Two more clusters included 70 probes that were up-regulated during the time course (clusters 4 and 5). The expression of 47 probes increased lately at T5 only (cluster 4) and these genes were involved in metabolic processes ("Hexose metabolic process" p=0.001, "Protein polymerization" p=0.007, "Regulation of homeostatic process" p=0.033…), apoptosis ("Regulation of apoptosis" p<0.001, programmed cell death p<0.001…) and immune and

inflammatory responses ("Inflammatory response" p=0.009, "Immune response" p=0.028, "Response to oxygen level" p=0.005, "Induction of positive Chemotaxis p=0.025). Finally 23 probes were up-regulated early after stimulation (at both T1 and T5) (cluster 5) and were involved in "protein N-terminus binding" (p<0.001).

1-2 MEC stimulation with *S. aureus* supernatant

After Sp stimulation, a total of 687 probes (486 genes) were found to be differentially expressed over time (Model M1.1, Additional file 4). The expression of 16 of these genes was measured by RT-qPCR: Three of them were down-regulated (*ctgf, cyr61* and egr1) and 13 were up-regulated *(cd14, cxcl2, cxcl5, ddit4, il1a, cxcl8, man1a1, nfil3, plat, saa3, slc2a3, sod2* and *vegfa)*. The differences in gene expression over time were confirmed for all genes (p<0.02) (Table 2). The main canonical pathways determined for the global list of DEG involved "Interleukin signaling" (IL-1, -3, -6, -10, -17, p<0.001 except for IL-22, p=0.036), "TLR pathway" (p<0.001), "CD40 pathway"(p<0.001), "TNFR1 pathway" (p=0.002) and "TNFR2 pathway" (p=0.001), "NFκB activation" (p<0.001) and "Myc-mediated apoptosis signalling" (p < 0.001).

Hierarchical clustering of the DEG as a function of their expression over time produced four clusters (Figure 2B). The first two clusters comprised 205 probes that were down-regulated after stimulation (clusters A and D). The expression of 73 probes was not affected 1 h after stimulation but dropped at 5 hrs (cluster A) (Figure 2B). The genes of this cluster were mainly involved in lipid and protein metabolic processes ("Sterol biosynthetic process" p<0.001, "Cholesterol metabolic process" p=0.001, "Fatty acid biosynthetic process" p=0.036, "Positive regulation of protein metabolic process" p=0.013, "Proteasomal protein catabolic process" p= 0.007…) and cell cycle ("Cell cycle" p<0.001, "Mitotic cell cycle" p<0.001, "Cell proliferation" p=0.006). The expression of the other 132 probes were down-regulated at T1 and then either remained at low levels at T5 or resumed normal levels (cluster D, Figure 2B). The genes of this cluster were involved in tissue development ("Muscle tissue development" p=0.001, "Tissue morphogenesis" p=0.006…), lipid metabolism ("Sterol biosynthetic process" p=0.001, "Cholesterol biosynthetic process" p=0.012…), cell cycle ("Cell cycle process" p=0.027, "Growth" p=0.029…) and apoptosis ("Induction of apoptosis" p=0.004, "Regulation of apoptosis" p=0.005, "Cell death" p=0.016). A third cluster comprised 79 probes that were down-regulated at T1 and then up-regulated at T5 (cluster B) (Figure 2B). These genes were involved in the cell cycle ("Regulation of cell cycle" p=0.003, "Cell proliferation" p=0.012) and apoptosis ("Regulation of apoptosis" p=0.023, "Cell death" p=0.036…) and in metabolic processes ("Negative regulation of metabolic process" p=0.048). The final cluster included 403 probes that were up-regulated at T5 (cluster C) (Figure 2B). These genes were mainly involved in the response to stress ("Response to reactive oxygen species" p=0.018, "Response to oxidative stress" p=0.019 "Response to osmotic stress" p=0.026, "Response to extracellular stimulus" p= 0.041…), cell movement ("Cell motion" p=0.002, "Cell motility" p=0.023, "Cell migration" p=0.025), cell communication ("Positive regulation of cell communication" p=0.017 and "Cell junction organization" p=0.028), apoptosis ("Regulation of apoptosis" p<0.001, "Apoptosis" p=0.006…), metabolic processes ("Positive regulation of biosynthetic process" p=0.002, "Protein transport" p=0.012, "Glycolysis" p=0.015, "Response to lipopolysaccharide" p=0.020…) and in "Mammary gland development" (p=0.009).

1-3 Comparison of the response to live bacteria or the supernatant

MEC stimulation with Sa or Sp resulted in different gene expression profiles., The results of hierarchical clustering based on the individual expression values of the samples stimulated either by Sa or Sp actually revealed that MEC responded weakly to Sa at 1h whereas the response was much stronger with Sp at the same time point (data not shown).

In addition, Venn diagram comparison of the two lists of probes from stimulation with either Sa or Sp, shows that 286 probes were common (Figure 3A). Indeed, both responses shared common pathways, but differed also largely.

To enhance insight into the regulation of MEC response to Sa and Sp, the evolution of the main biological functions with time through identification of significant GO functions (ease score < 0.05, DAVID analysis) was compared. Some genes involved in "Muscle and tissue development" were down-regulated when MEC were stimulated with *S. aureus* (clusters 1 and D), except for some of these genes that were also involved in "Blood vessel morphogenesis" and were up-regulated at T5 in both cases (clusters 4 and C). Genes involved in "Mammary gland development" were up-regulated at T5 only with Sp (cluster C). In addition, "Mitosis" and "Cell proliferation" were affected in both conditions (clusters 0, 1, 2, A and D).

Following stimulation, function of cytoskeleton and membrane remodelling changed. The "Endocytosis" pathway was activated after stimulation by Sp (cluster C) but inhibited after stimulation by Sa (cluster 1). Cell communication was negatively regulated when cells were stimulated with Sa ("Negative regulation of cell communication", cluster 4) but was promoted when cells were stimulated by Sp ("Positive regulation of cell communication", cluster C) with an up-regulation of genes involved in "Membrane organization", "Vesicle mediated transport", "Cell-matrix adhesion" and "Cell junction assembly". The cellular metabolism was also affected by the stimulations: with Sa, the catabolism was enhanced with "Regulation of caspase activity" and biosynthetic processes were decreased with "Negative regulation of macromolecule metabolic process" (clusters 0 and 1); cellular respiration was at first activated and then inhibited ("Respiratory electron chain transport", cluster 2). After stimulation by Sp, the lipid biosynthetic metabolism was highly affected ("Lipid biosynthetic process", clusters A and D). The genes involved in "Hexose catabolism process" were up-regulated (clusters 4 and C). Genes involved in the regulation of gene expression were down-regulated after stimulation by Sa ("Negative regulation of gene expression" in cluster 0 and "Positive regulation of gene expression" in cluster 1) and up-regulated after stimulation by Sp ("Positive regulation of gene expression", cluster C). Furthermore, MEC expressed genes that revealed responses to extracellular stimuli. "Immune response" and "Inflammatory response", with induction of "Chemotaxis" were activated only following stimulation by Sa (cluster 4), whereas after stimulation with Sp, the main functions pointed towards a "Cellular response to oxidative stress" (cluster C). Expression of apoptosis-related genes was either up-regulated (clusters 3, 4, b and C) or down-regulated (clusters 0, 1 and D) depending on the condition.

In addition, InnateDB analysis showed that four transcription factors (TFDP1, HIF-1, AHR and NRF1, $p<0.001$) can bind 72, 57, 90 and 58 promoters of genes that were down-regulated after stimulation by Sa or Sp (clusters C0, C1, CA and CD). No transcription factor was found to significantly bind the promoters of the up-regulated genes (clusters C4, C5, CB and CC).

Furthermore, a direct comparison of MEC response to Sa and Sp was also performed by ANOVA as a function of time (Model M1.2). Indeed, 116 and 44 probes (corresponding to

104 and 42 genes) were identified as differentially expressed between Sa and Sp, at 1 and 5 hr post-stimulation, respectively (Additional files 5 and 6). A set of 38 probes belonged to both lists (Figure 3B). Two sets of 91% and 93% of the DEG were more expressed in Sa than Sp condition at 1 and 5 hours post-stimulation, respectively. On the contrary, the genes *cxcl8, egr1, tnfaip3, cxcl2, areg, fos, ptgs2, dusp5* and *trib1,* at 1hr, and the genes *areg, dusp5* and *trib1* at 5 hr were expressed at higher levels in *Sp* than *Sa* condition.

At T1, the genes that were more highly expressed in Sp were enriched for functions related to the "Inflammatory response" (p=0.015) and in "Learning or memory" (p=0.002). On the contrary, the genes that were more highly expressed after stimulation by Sa were involved in "Cellular response to oxidative stress" (p=0.018), "Positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade" (p=0.027), "Cellular macromolecule organization" (p=0.001), "Intracellular transport" (p=0.002), "Negative regulation of translation" (p=0.018), in "Positive regulation of cell communication" (p=0.004) and "Cell proliferation" (p=0.049), and "Cell death" (p=0.011). The list of DEG with higher expression after Sa than Sp stimulation at T5 was enriched for the same GO functions as the one at T1, except for "Cell death". No GO function was found to be enriched for the list of the DEG with higher expression after Sp stimulation at T5.

Then, the gene profiles of MEC responses to different forms of *S. aureus* (heat-killed bacteria, live bacteria and culture supernatant) was compared by Venn diagram. MEC stimulations by heat-killed bacteria in Brand *et al.* (14) and Gunther *et al.* (26) analyses were included (Figure 4A). For Brand's analysis the DEG lists of MEC in the time course for resistant and susceptible cows were pooled together. A set of 28 genes belonged to "live bacteria" or "supernatant stimulation" lists and to at least one of the "heat-killed bacteria" lists. The Ingenuity network analysis of this gene set scored 38 and involved 16 genes (Figure 4B). It was characterized by three main function sthat were"Cell death", "Gene expression" and "Inflammatory response".

2- Comparison of MEC response between genetic lines

When comparing the MECs of resistant and susceptible animals on the overall experiment, after correction for the other effects (Model M2.1), only 23 probes (20 genes) were found to be differentially expressed (Table 3). Of these 20 genes, three were expressed at higher levels in the MECs of resistant animals (*cat, plet1* and *ppa1*). The expression of eight genes was measured by RT-qPCR in the samples collected at Tref, T1Sp, T5Sp and T5Sa. The differences of expression were confirmed for six of the eight genes, but *saa3* and *cxcl8* were not found to be differentially expressed between the lines by RT-qPCR (Table 4).

The gene list was enriched for the cellular response to "Oxidation reduction" (p=0.031) with the genes (*cat, prdx1* and *cyp1b1* and *fth1*). Interestingly, 15 of the 23 DEG were involved in one IPA network that scored 39 (Figure 5). These molecules were mainly linked to genes involved in the regulation of inflammation (*nfκb* and *myc*) and *tp53*. IPA analysis of DEG between resistant and susceptible animals showed enrichment for "Xenobiotic metabolism signalling" (p=0.004, *gstm3, cat* and *fth1*) and "NRF2-mediated oxidative stress response" (p<0.001, *gstm3, cat, fth1* and *prdx1*), whereas no canonical pathway was significant.

We showed above that the gene expression profile of MEC was strongly modified by the two stimulations (Model M1.1 and M1.2). For that reason, MEC differences between resistant and susceptible animals were also analyzed within each time-stimulation condition. In all the conditions, three genes (*gstm3, slc2a3* and *plat*) were more expressed in the MEC of the susceptible animals and conversely, *cat* was more expressed in the MEC of the resistant ones. Prior to stimulation (Tref), ten DEG were identified between resistant and susceptible animals, eight of these had been identified above in the global analysis of the line effect (Model M2.1), but *zak* and a non-classical MHC class I gene were new. All these ten DEG were also differentially expressed in at least one another condition. The *MHC Class I* gene was up-regulated in MECs of the resistant animals only after stimulation by Sa (T1Sa and T5Sa). The number of DEG between resistant and susceptible animals was higher at T5 than at T1 after stimulation by Sp (with 17 and 11 genes at T5 and T1, respectively).

To further look for gene expression differences between the lines, gene set enrichment analysis (GSEA) was performed. Although 48 gene sets in the collections C2 (curated gene sets), C3 (motif gene sets), C4 (computational gene sets) and C5 (GO gene sets) were candidate gene set for being enriched (as they contained at least 15 focus genes), none was significant, indicating small differences of gene expression response between genetic backgrounds.

Discussion

In the present study, we analyzed the response of an *in vitro* culture of MEC to the presence of *S. aureus* over a short time course. Using live bacteria, we focused on the early response of MEC to avoid the cytotoxic effects that result in RNA degradation and possibly, a difference of bacterial development between conditions. The expression of approximately 12,000 genes was analyzed using an ovine pangenomic microarray. Although there was a high variability in the individual responses to *S. aureus*, more differences were found between the two different conditions of stimulation than between genetic backgrounds with a difference of susceptibility to *Staphylococcus* spp.

1- MEC responses to live *S. aureus* or bacterial supernatant

During natural IMI, MEC form a physical barrier that prevents bacteria to enter host tissues. *S. aureus* is known to secrete a number of proteins and to release a number of cell wall-associated molecules that have the potential to activate the innate immune system, under *in vitro* and *in vivo* conditions (21). Culture supernatant is a stimulus per se, representative of what happens during an infection, where live staphylococci release an array of molecules stimulating, luring, evading, or impairing the defences of the host. Thus the two forms of stimulation used in this *in vitro* culture model are therefore both relevant, but could however induce distinct biological effects.

1-1 Similarities between live bacteria and soluble factor stimulations

Loss of MEC functionality

Our first analyses clearly showed a down-regulation of the MEC genes involved in cell proliferation, metabolic processes and transcription functions after interaction with *S.*

aureus. Here, *S. aureus* induced the down-regulation of genes involved in the cell cycle and mitosis, especially after stimulation by Sa. Upon contact with Sa, MEC mitosis probably arrested as previously highlighted by Matthews *et al.* (35). Sp also affects the expression of genes involved in the cell cycle. Conversely, changes in functions associated with cell proliferation were not reported in human airway epithelial cells following stimulation with Sp (36), although in the presence of streptococcal lipoteichoic acid, a major component of Sp, the proliferation of bovine MEC was shown to be inhibited in a dose-dependent manner (15).

Cell metabolism was also highly affected upon contact with bacteria or their soluble factors. Protein catabolism and lipid biosynthesis were inhibited after stimulation with both Sa and Sp, whereas hexose metabolic processes were enhanced. Indeed, *S. aureus* seems to alter the metabolic and secretory functions of MEC and this is in accordance with the diminution of milk production during mammary infection (63). In addition, as shown by other authors (32, 36), the presence of Sa strongly modified the regulation of gene expression whereas transcriptional or translation functions were more affected after stimulation by Sp. In conclusion, MEC proliferation, metabolism and transcription are largely altered upon interaction with *S. aureus*.

MEC apoptosis

Many of the MEC genes that were modulated in the time course experiment are involved in cell death and its regulation. The expression of such genes was either up- or down-regulated depending on the nature of the stimulus and pointed toward a delay in MEC response to apoptosis. Regulation of apoptosis is a very complex phenomenon and the analysis of the MEC transcriptome in the various conditions of stimulation tested in our study confirms this complexity. In our study, the time course experiment in which MEC were stimulated with either soluble bacterial components or Sa showed that, on the one hand, apoptosis was enhanced with the down-regulation of genes encoding proteins that inhibit apoptosis (*birc5* and *bcl7c*), and the up-regulation of genes that actually induce apoptosis (*tnfa, tnfrsf6b* and interleukins *il1a, il1b* and *cxcl8*); on the other hand, apoptosis was inhibited with the down-regulation of apoptosis genes (*casp3*, *stk17a* and *tnfrsf12a*) and the up-regulation of *tnfaip3* that inhibits NFκB activation and TNF-mediated apoptosis. Moreilhon *et al.* also reported the presence of anti-apoptotic genes in airway cells stimulated by Sp, and to a lesser extent by Sa (36), whereas many other reports show pro-apoptotic mechanisms consecutive to an infection (5, 32, 50, 54).

MEC immune and inflammatory responses

The chemokines *ccl20*, *cxcl3* (*groα*) and *cxcl8 (il8)* were up-regulated at the RNA level. Over-exression of CxCL3 and CxCL8 was also detected at the protein levels. The up-regulation of these chemokines was also demonstrated in MEC after LTA stimulation (13, 43) or after contact with Sa (31, 32, 36). These results support the idea that MEC attract neutrophils in the mammary gland in the presence of *S. aureus* (3, 17).

In parallel, the genes encoding the pro-inflammatory cytokines *il1a*, *tnfa* were up-regulated in both conditions, whereas *il1r1*, and *il1b* were up-regulated only when cells were stimulated with Sa. Identical results were reported previously for *il1a* (24, 36), *tnfa* (24, 28, 31, 33, 60) and *il1b* (28, 31–33, 36, 54, 60). On the contrary, Gunther *et al.* showed an up-regulation of *il6* but not of *il1a* and *tnfa* in MEC stimulated by heat-inactivated *S. aureus* (26). The genes encoding *nfkbia*, *nfkbiz*, and *rela* were up-regulated in cells treated with Sa and Sp, respectively. Bottero *et al.* have shown that the transcriptional level of *nfkbia* was well

correlated with the activation of the NFκB protein complex (10). The genes encoding NFκB-REL proteins have previously been shown to be regulated after infections by diverse bacteria (7, 26, 32, 36, 64). The serum amyloid 3 (*saa3*), a marker of inflammation, was up-regulated following stimulation by either Sa or Sp, as previously reported in bovine MEC stimulated with heat-killed *S. aureus* (54) or LTA (62). No up-regulation of *tlr2* was observed in our study in contrast to several other reports (28, 36, 54).

As a result, diminution of MEC metabolic functions that should diminish their capacity to synthesize milk components, regulation of MEC apoptosis and enhanced production of immune mediators, which are all observed as a result of mammary gland infection, suggest that the *in vitro* culture model of MEC is able to reproduce, at least partially, the local *in vivo* responses to an *S. aureus* infection.

1-2 Differences in MEC responses to bacterial cell and supernatant stimulations

Surprisingly MEC gene expression profile was modified to a little greater extent in response to bacterial soluble factors than in response to Sa (n= 687 probes for Sp vs n=531 for Sa). Nevertheless, it seems that the difference observed between MEC responses to Sa and Sp are indeed considerable during the early phase of the stimulation, but greatly reduced later on. The more homogenous distribution of soluble factors within the culture medium and the more diffuse contact with the cell layer may partly explain this difference.

Some specific features were observed. MEC response to oxidative stress was higher after stimulation by Sa. On the contrary, MEC immune response was more pronounced after stimulation by Sp than by Sa during the early phase of stimulation. In fact in accordance with Moreilhon *et al.* (36), the expression of *cxcl8, egr1, tnfaip3, cxcl2, areg, ptgs2* and *fos* was higher at the 1-hour time point after stimulation by Sp than by Sa, whereas at the 5-hour time point only *areg* was up-regulated in cells stimulated by Sp.

The comparison of MEC responses in function of the forms of the stimulation showed that even if using killed bacteria is an easier way to stimulate cells in experimental models, it does not mimic exact reality of infection.

2- Differences between resistant and susceptible animals

Although MEC stimulation by live *S. aureus* or its supernatant caused considerable gene expression remodelling and revealed some immune responsiveness, only blurred information was obtained when resistant and susceptible animals were compared. Very few genes were differentially expressed between the two groups of animals (20 genes, 23 probes) and no clear biological signification could be found from the list of identified genes. Only three genes were up-regulated in our resistant group: *ppa1, plet1* and *cat*. The protein encoded by *ppa1* is a member of the inorganic pyrophosphatase family that catalyzes the hydrolysis of pyrophosphate into inorganic phosphate. The gene *cat* encodes a catalase, a key antioxidant enzyme in cellular defence against oxidative stress that protects MEC against *S. aureus* virulent effects (22, 34). Actually, catalase converts reactive oxygen species such as hydrogen peroxide into water and oxygen and thereby neutralizes the toxic effects of hydrogen peroxide. *Plet1* may participate in the wound response during the healing process and promotes wound repair.

Nevertheless network analysis enabled to gather together 15 of the 20 DEG between resistant and susceptible animals around TP53, NFκB and MYC (Figure 5). The TP53 transcription factor is largely known in cell cycle arrest and is mainly studied in the context of

cancer. It was one of the most DEG between resistant and susceptible animals in infected MSC (8), suggesting that it may play a role in the differences between the genetic lines. NFκB and MYC play major roles in inflammatory processes. The NFκB transcription factor is activated by TLR pathway, it activates different inflammatory genes and it leads to the activation of genes that are able to eliminate the pathogens (19). It can also activate the transcription factor MYC (20) and when interacting with P53, it can play a central role in cell stress outcome (56).

In the model of cows selected BTA18 mastitis QTL, gene profiles in the time course of the experiment were characterized in resistant and in susceptible cows after heat-inactivated *S. aureus* stimulation, but there was no direct comparison of the two groups of cows in a global statistical model (14). Thus, the studies cannot be compared directly. Nevertheless, of the 20 DEG that we have identified between resistant and susceptible sheep, four genes were differentially expressed in the time course in resistant and susceptible cows (*cxcl8, saa3, slc2a3* and *ppp1r15a*), as were also sub-units of NFkB (14). In our study, expression of these four genes was higher in MEC of susceptible sheep according to the microarray results while we have not confirmed expression of *cxcl8* and *saa3* by RT-qPCR. CXCL8 is highly involved in neutrophil recruitment (61) and SAA3 is an inflammation marker (62). In the bovine study, the genes *slc2a3* and *cxcl8* were activated only in susceptible cows (14). Thus, sheep and bovine results seem to reveal a higher expression of *slc2a3* and *cxcl8* in mastitis-susceptible animals. However, the same group had shown a higher expression of *cxcl8* in MEC of resistant animals in a previous study (25) which is the opposite of their more recent results (14) and giving confusion on the sense of CXCL8 differential expression on its role. They also showed that the genes *saa3* and *ppp1r15a* were activated in the time course in resistant cows only (14), whereas we found that their expression was higher in MEC of susceptible sheep. About NKkB sub-units, they showed activation of *nfkb1 nfkb2*, *nfkbia* and *nfkbie* in the course of the stimulation only in resistant cows, except for *nfkbia* which was also slightly activated in susceptible cows (14). Even if we did not identified *nfkb* as differentially expressed between resistant and susceptible sheep, we showed that it was highly associated to the DEG between the divergent lines. This observation highlights the fact that inflammatory processes are of main importance in MEC response to *S. aureus*. To explain the differences between sheep and cow models we assume i) that although cows and sheep are phylo-genetically close, their capacity to respond to pathogens might be slightly different, ii) that selections of cows on one QTL and selection of ewes on SCS EBV are probably not based on the same genetic mechanisms, and that probably explain the difference of results and iii) that there may be some differences due to time of sampling as we focused on the early 5 hrs of stimulation and they studied a longer period of 24 hrs.

Previously, the low SCS line was shown to be less susceptible to *Staphylococcus* IMI (49) or experimental inoculations (8), but the gene expression of the MEC after *in vitro* stimulation by *S. aureus* did not reveal any straightforward contrasts that could explain the difference of resistance to IMI. Swanson *et al.* have shown that *in vitro* MEC response to *Streptococcus uberis* was different to the *in vivo* response upon experimental inoculation of the mammary gland (54). We might thus hypothesize that the *in vitro* model using MEC, isolated from other immune cells, insufficiently accounts for the complex network of interactions that occur during pathogen invasion, and thus is a limited representation of *in vivo* processes. Indeed, intestinal epithelial cell response to *in vitro* stimulations with different kinds of bacteria has been shown to depend on the presence of other cell types such as DC (65). Intestinal epithelial cells can play a role in shaping DC functions, which then leads to either a tolerogenic or an inflammatory immune response depending on the local status of the intestine (46).

Also, the limited amount of information obtained from the comparison of MEC from the two lines of ewes may have resulted, at least partly, from technical constraints. On the one hand, the experiment was limited to a small number of animals per line. On the other hand, the array that we used does not contain more than a third of the sheep genome and therefore might not include some of the focus genes that could explain the differences between resistant and susceptible animals. Our previous experiments are not in favour of these hypotheses. Indeed, the gene expression profiles of resistant and susceptible animals have already been studied in two other cell types: MSC collected after *S. epidermidis* or *S. aureus* inoculations into the mammary gland (8) and *S. aureus*-stimulated DC (58) with two groups of four (58) or six (8) sheep. In both cases significant differences were detected.

In conclusion, we evidenced that stimulation by bacteria soluble factors do partially mimic infection with live bacteria. MEC of the resistant and susceptible sheep express little differences in the early response to *S. aureus* stimulation even if inflammatory mechanisms were largely mobilized. In parallel, as interactions between cell types can considerably modify their gene transcription profiles, co-cultures of several cell types at the same time with bacteria may be useful to reproduce the network of interactions that exist during an infection.

Acknowledgments

Authors acknowledge technical support provided by Olivier Bouchez for RT-qPCR and Lidwine Trouilh for microarray experiments at the Genomic platform GenoToul Toulouse-Midi-Pyrénées. We also appreciated Philippe Bardou's help when depositing the microarray data on the NCBI server. Authors highly acknowledge the INRA and ENVT staff members in charge of animal breeding and care.

Grants

This work was financed by the European Network of Excellence EADGENE, ANR Génanimal and APIS-GENE.

References

1. **Aderem A, Ulevitch RJ**. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782-787, 2000.
2. **Van Amersfoort ES, Van Berkel TJC, Kuiper J**. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 379-414, 2003.
3. **Barber MR, Pantschenko AG, Hinckley LS, Yang TJ**. Inducible and constitutive in vitro neutrophil chemokine expression by mammary epithelial and myoepithelial cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 791-798, 1999.
4. **Barkema HW, Green MJ, Bradley AJ, Zadoks RN**. Invited review: The role of contagious disease in udder health. *J. Dairy Sci* 92: 4717-4729, 2009.
5. **Bayles KW, Wesson CA, Liou LE, Fox LK, Bohach GA, Trumble WR**. Intracellular Staphylococcus aureus escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* 66: 336-342, 1998.

6. **Bergonier D, de Crémoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X**. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res.* 34: 689-716, 2003.

7. **Boldrick JC, Alizadeh AA, Diehn M, Dudoit S, Liu CL, Belcher CE, Botstein D, Staudt LM, Brown PO, Relman DA**. Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99: 972-977, 2002.

8. **Bonnefont C, Toufeer M, Caubet C, Foulon E, Tasca C, Aurel MR, Bergonier D, Boullier S, Robert-Granie C, Foucras G, Rupp R**. Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus. *BMC Genomics* 12: 208, 2011.

9. **Bossers K, Ylstra B, Brakenhoff RH, Smeets SJ, Verhaagen J, van de Wiel MA**. Intensity-based analysis of dual-color gene expression data as an alternative to ratio-based analysis to enhance reproducibility. *BMC Genomics* 11, 2010.

10. **Bottero V, Imbert V, Frelin C, Formento JL, Peyron JF**. Monitoring NF-kappa B transactivation potential via real-time PCR quantification of I kappa B-alpha gene expression. *Mol. Diagn* 7: 187-194, 2003.

11. **Boudjellab N, Chan-Tang HS, Zhao X**. Bovine interleukin-1 expression by cultured mammary epithelial cells (MAC-T) and its involvement in the release of MAC-T derived interleukin-8. *Comp. Physiol. Biochem.* 127: 191-199, 2000.

12. **Bougarn S, Cunha P, Gilbert FB, Meurens F, Rainard P**. Technical note: Validation of candidate reference genes for normalization of quantitative PCR in bovine mammary epithelial cells responding to inflammatory stimuli. *Journal of Dairy Science* 94: 2425-2430, 2011.

13. **Bougarn S, Cunha P, Harmache A, Fromageau A, Gilbert FB, Rainard P**. Muramyl dipeptide synergizes with Staphylococcus aureus lipoteichoic acid to recruit neutrophils in the mammary gland and to stimulate mammary epithelial cells. *Clin. Vaccine Immunol.* 17: 1797-1809, 2010.

14. **Brand B, Hartmann A, Repsilber D, Griesbeck-Zilch B, Wellnitz O, Kuhn C, Ponsuksili S, Meyer HH, Schwerin M**. Comparative expression profiling of E. coli and S. aureus inoculated primary mammary gland cells sampled from cows with different genetic predispositions for somatic cell score. *Genet Sel Evol* 43: 24, 2011.

15. **Calvinho LF, Almeida RA, Oliver SP**. Influence of bacterial factors on proliferation of bovine mammary epithelial cells. *Rev. Argent. Microbiol* 33: 28-35, 2001.

16. **Casel P, Moreews F, Lagarrigue S, Klopp C**. sigReannot: an oligo-set re-annotation pipeline based on similarities with the Ensembl transcripts and Unigene clusters. *BMC Proc* 3: S3, 2009.

17. **Van Damme J, Wuyts A, Froyen G, Van Coillie E, Struyf S, Billiau A, Proost P, Wang J, Opdenakker G**. Granulocyte chemotactic protein-2 and related CXC chemokines: from gene regulation to receptor usage. *J. Leukoc. Biol.* 62: 563 -569, 1997.

18. **Davies G, Genini S, Bishop SC, Giuffra E**. An Assessment of Opportunities to Dissect Host Genetic Variation in Resistance to Infectious Diseases in Livestock. *animal* 3: 415-436, 2009.

19. **Doyle SL, O'Neill LAJ**. Toll-like receptors: From the discovery of NF[kappa]B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochemical Pharmacology* 72: 1102-1113, 2006.

20. **Duyao MP, Kessler DJ, Spicer DB, Sonenshein GE**. Transactivation of the murine c-myc gene by HTLV-1 tax is mediated by NFkB. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 752-754, 1992.

21. **Fournier B, Philpott DJ**. Recognition of Staphylococcus aureus by the innate immune system. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 521-540, 2005.

22. **de la Fuente R, Díez RM, Domínguez-Bernal G, Orden JA, Martínez-Pulgarín S**. Restoring catalase activity in Staphylococcus aureus subsp. anaerobius leads to loss of pathogenicity for lambs. *Vet. Res.* 41, 2010.

23. **Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B**. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of Staphylococcus aureus strains isolated from cows with mastitis. *J. Clin. Microbiol* 40: 4060-4067, 2002.

24. **Griesbeck-Zilch B, Meyer HHD, Kuhn CH, Schwerin M, Wellnitz O**. Staphylococcus aureus and Escherichia coli cause deviating expression profiles of cytokines and lactoferrin messenger ribonucleic acid in mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 91: 2215-2224, 2008.

25. **Griesbeck-Zilch B, Osman M, Kuhn C, Schwerin M, Bruckmaier RH, Pfaffl MW, Hammerle-Fickinger A, Meyer HHD, Wellnitz O**. Analysis of key molecules of the innate immune system in mammary epithelial cells isolated from marker-assisted and conventionally selected cattle. *J. Dairy Sci.* 92: 4621-4633, 2009.

26. **Gunther J, Esch K, Poschadel N, Petzl W, Zerbe H, Mitterhuemer S, Blum H, Seyfert H-M**. Comparative kinetics of Escherichia coli- and Staphylococcus aureus-specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that S. aureus elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha. *Infection and Immunity* 79: 695-707, 2011.

27. **Gunther J, Koczan D, Yang W, Nurnberg G, Repsilber D, Schuberth HJ, Park Z, Maqbool N, Molenaar A, Seyfert HM**. Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with Escherichia coli. *Vet Res* 40, 2009.

28. **Holland DB, Bojar RA, Farrar MD, Holland KT**. Differential innate immune responses of a living skin equivalent model colonized by Staphylococcus epidermidis or Staphylococcus aureus. *FEMS Microbiol Lett* 290: 149-155, 2009.

29. **Korhonen H, Marnila P, Gill HS**. Milk immunoglobulins and complement factors. *Br J Nutr* 84: 75-80, 2000.

30. **Kuhn C, Reinhardt F, Schwerin M**. Marker assisted selection of heifers improved milk somatic cell countcompared to selection on conventional pedigree breeding values. *Arch. Tierz., Dummerstorf* : 23-32, 2008.

31. **Lahouassa H, Moussay E, Rainard P, Riollet C**. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Cytokine* 38: 12-21, 2007.

32. **Lutzow SYC, Donaldson L, Gray CP, Vuocolo T, Pearson RD, Reverter A, Byrne KA, Sheehy PA, Windon R, Tellam RL**. Identification of immune genes and

proteins involved in the response of bovine mammary tissue to Staphylococcus aureus infection. *BMC Vet Res* 4, 2008.

33. **Lutzow SYC, Gray C, Vuocolo T, Donaldson L, Broadway M, Tellam R**. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine* 31: 72-86, 2005.

34. **Martinez-Pulgarin S, Dominguez-Bernal G, Orden JA, de la Fuente R**. Simultaneous lack of catalase and beta-toxin in Staphylococcus aureus leads to increased intracellular survival in macrophages and epithelial cells and to attenuated virulence in murine and ovine models. *Microbiology* 155: 1505-1515, 2009.

35. **Matthews KR, Almeida RA, Oliver SP**. Bovine mammary epithelial cell invasion by Streptococcus uberis. *Infect. Immun.* 62: 5641-5646, 1994.

36. **Moreilhon C, Gras D, Hologne C, Bajolet O, Cottrez F, Magnone V, Merten M, Groux H, Puchelle E, Barbry P**. Live Staphylococcus aureus and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells. *Physioll Genomics* 20: 244-255, 2005.

37. **Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW**. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. *Vet. Res.* 34: 597-627, 2003.

38. **Paape MJ, Mehrzad J, Zhao X, Detilleux J, Burvenich C**. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Mammary Gland Biol* 7: 109-21, 2002.

39. **Pareek R, Wellnitz O, Van Dorp R, Burton J, Kerr D**. Immunorelevant gene expression in LPS-challenged bovine mammary epithelial cells. *J Appl Genet* 46: 171-7, 2005.

40. **Pawitan Y, Michiels S, Koscielny S, Gusnanto A, Ploner A**. False discovery rate, sensitivity and sample size for microarray studies. *Bioinformatics* 21: 3017 - 3024, 2005.

41. **Pisoni G, Moroni P, Genini S, Stella A, Boettcher PJ, Cremonesi P, Scaccabarozzi L, Giuffra E, Castiglioni B**. Differentially expressed genes associated with Staphylococcus aureus mastitis in dairy goats. *Vet Immunol Immunop* 135: 208-217, 2010.

42. **Rainard P, Corrales JC, Barrio MB, Cochard T, Poutrel B**. Leucotoxic activities of Staphylococcus aureus strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF'-PV leukotoxin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol* 10: 272-277, 2003.

43. **Rainard P, Fromageau A, Cunha P, Gilbert FB**. Staphylococcus aureus lipoteichoic acid triggers inflammation in the lactating bovine mammary gland. *Vet Res* 39: 13, 2008.

44. **Rainard P, Riollet C, Berthon P, Cunha P, Fromageau A, Rossignol C, Gilbert FB**. The chemokine CXCL3 is responsible for the constitutive chemotactic activity of bovine milk for neutrophils. *Mol. Immunol* 45: 4020-4027, 2008.

45. **Rainard P, Riollet C**. Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reprod. Nutr. Dev.* 43: 439-457, 2003.

46. **Rescigno M, Lopatin U, Chieppa M**. Interactions among dendritic cells, macrophages, and epithelial cells in the gut: implications for immune tolerance. *Curr. Opin. Immunol* 20: 669-675, 2008.

47. **Riollet C, Rainard P, Poutrel B**. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic Staphylococcus aureus infection. *J. Dairy Sci.* 84: 1077-1084, 2001.

48. **Rozen S, Skaletsky H**. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *Method Mol Biol* 132: 365 - 386, 2000.

49. **Rupp R, Bergonier D, Dion S, Hygonenq MC, Aurel MR, Robert-Granié C, Foucras G**. Response to somatic cell count-based selection for mastitis resistance in a divergent selection experiment sheep. *J. Dairy Sci.* 92: 1203-1219, 2009.

50. **da Silva MCA, Zahm J-M, Gras D, Bajolet O, Abely M, Hinnrasky J, Milliot M, de Assis MC, Hologne C, Bonnet N, Merten M, Plotkowski MC, Puchelle E**. Dynamic interaction between airway epithelial cells and Staphylococcus aureus. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 287: L543-551, 2004.

51. **Smyth GK**. Limma: linear models for microarray data. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. .

52. **Sordillo LM**. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livest Prod Sci* 98: 89-99, 2005.

53. **Sutra L, Poutrel B**. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to Staphylococcus aureus. *J Med Microbiol* 40: 79-89, 1994.

54. **Swanson KM, Stelwagen K, Dobson J, Henderson HV, Davis SR, Farr VC, Singh K**. Transcriptome profiling of Streptococcus uberis-induced mastitis reveals fundamental differences between immune gene expression in the mammary gland and in a primary cell culture model. *J. Dairy Sci.* 92, 2009.

55. **Tao WJ, Mallard B**. Differentially expressed genes associated with Staphylococcus aureus mastitis of Canadian Holstein cows. *Vet Immunol Immunop* 120: 201-211, 2007.

56. **Tergaonkar V, Perkins ND**. p53 and NF-[kappa]B Crosstalk: IKK[alpha] Tips the Balance. *Molecular Cell* 26: 158-159, 2007.

57. **Toufeer M, Bonnefont C, Foulon E, Caubet C, Tasca C, Aurel MR, Robert-Granié C, Rupp R, Foucras G**. Gene expression profiling of BM-derived dendritic cells reveals important mechanisms associated with predisposition to Staphylococcus infections. *PLOS one* 6: e22147, 2011.

58. **Toufeer M, Bonnefont CMD, Foulon E, Caubet C, Tasca C, Aurel M-R, Robert-Granié C, Rupp R, Foucras G**. Gene Expression Profiling of Dendritic Cells Reveals Important Mechanisms Associated with Predisposition to Staphylococcus Infections. *PLoS ONE* 6: e22147, 2011.

59. **Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F**. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034, 2002.

60. **Veldkamp KE, VanKessel KPM, Verhoef J, VanStrijp JAG**. Staphylococcal culture supernates stimulate human phagocytes. *Inflammation* 21: 541-551, 1997.

61. **Vetillard J, Drouet M, Neildez-Nguyen TM, Mestries JC, Mathieu J, Thierry D, Herodin F**. Interleukine-8 acts as a strong peripheral blood granulocyte-recruiting agent rather than as a hematopoietic progenitor cell-mobilizing factor. *J. Hematother. Stem Cell Res* 8: 365-379, 1999.

62. **Weber A, Weber AT, McDonald TL, Larson MA**. Staphylococcus aureus lipotechoic acid induces differential expression of bovine serum amyloid A3 (SAA3) by mammary epithelial cells: Implications for early diagnosis of mastitis. *Vet Immunol Immunop* 109: 79-83, 2006.

63. **Wells SJ, Ott SL, Hillberg Seitzinger A**. Key Health Issues for Dairy Cattle--New and Old. *J. Dairy Sci.* 81: 3029-3035, 1998.

64. **Yang W, Zerbe H, Petzl W, Brunner RM, Gunther J, Draing C, von AS, Schuberth HJ, Seyfert HM**. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from Staphylococcus aureus (S. aureus) and E. coli, but S. aureus fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol Immunol* 45: 1385 - 1397, 2008.

65. **Zoumpopoulou G, Tsakalidou E, Dewulf J, Pot B, Grangette C**. Differential crosstalk between epithelial cells, dendritic cells and bacteria in a co-culture model. *International Journal of Food Microbiology* 131: 40-51, 2009.

Figure legends

Figure 1: RT-qPCR of representative genes. RNA quantification of *cxcl3* (figure A), *cxcl8* (figure B), *ccl20* (figure C), *tnfa* (figure D) and *il1b* (figure E) by RTq-PCR without stimulat [illegible] Sa and T5Sa) or Sp (T1Sp and T5Sp) a [illegible] not measured after 1 hour PS with Sa.

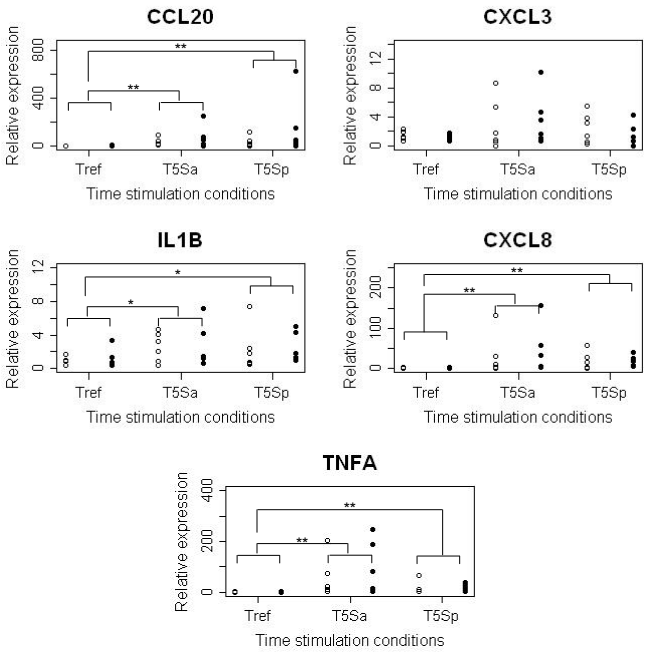
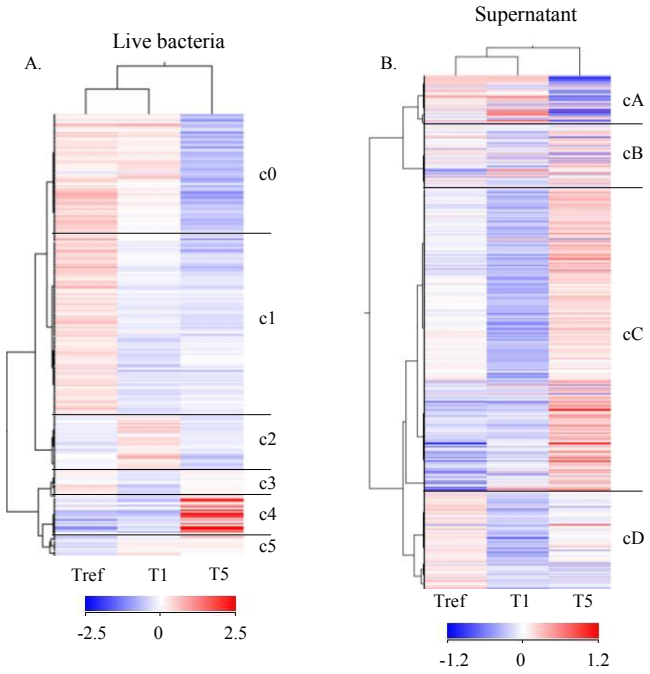


Figure 2: Hierarchical clustering of the DEG in the time course following stimulation with Sa (Figure A, n = 531 genes) or Sp (Figure B, n = 687 genes). Each line corresponds to one gene and each column is the mean value of all samples after 0, 1 or 5 hours of stimulation. The clustering algorithm was based on Pearson correlation and was computed with GeneSpring®. It determined the tree on graph left side. It discriminated six clusters for Sa data (named from c0 to c5, Figure A) and four clusters for Sp data (named cA, cB, cC and cD, Figure B).



the list
probes)
belonge
T1 (n=

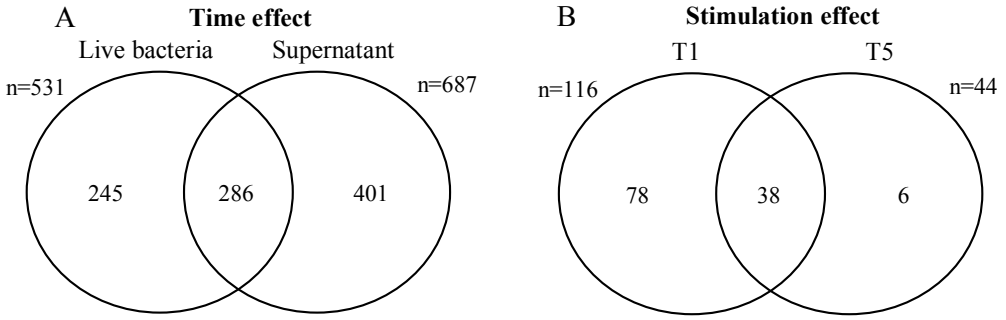


Figure 4: Comparison of DEG lists of MEC stimulated *in vitro* in function of *S. aureus* stimulation form (heat-killed bacteria, live bacteria or culture supernatant) by Venn diagrams (Figure A). Two DEG data sets were included with MEC stimulated by heat-killed bacteria. The Brand's one corresponds to the pooled lists of MEC DEG in the time course for resistant and susceptible cows (14) and the other is from Gunther *et al.* (26). The hatched zone corresponds to 28 DEG that are identified after MEC stimulation by at least two forms of *S. aureus*. The network analysis of this set of genes was presented in Figure B. The IPA network includes 16 genes and scores 38.

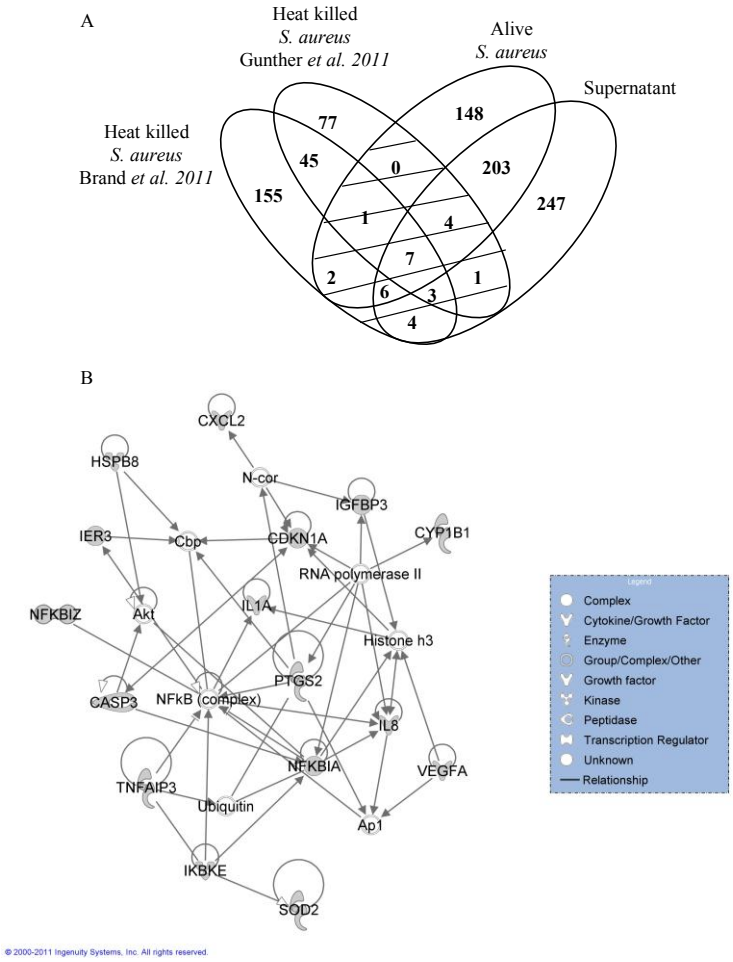
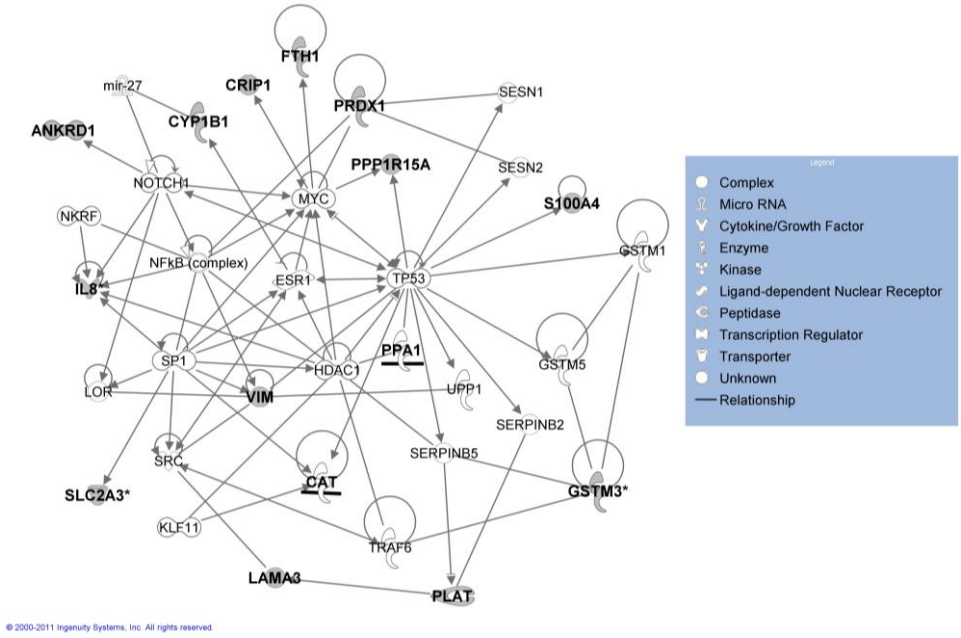


Figure 5: Ingenuity networks of the DEG between MECs of resistant and susceptible animals. This network involves 15 of the 23 DE genes and scores 39 that reveal a high level of significance. The DEG are in bold; the up-regulated genes in the resistant animals are underlined; the genes up-regulated in susceptible animals are in grey. The main functions of this network were cancer, cellular movement and gastrointestinal disease.



Tables

Table 1: Sequences of the couples of primers used in RT-qPCR.

HGNC	Accession Number	PRIMER_F1_SEQ	PRIMER_R1_SEQ	Description
AXL	DY498294	atatccgggagtggagaaca	acatcagggcatacagtcca	AXL receptor tyrosine kinase
CASP8	EE784040	gggtgaagacattctgaccatc	aagtaggttgcggcatctgt	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
CAT	EE850070	tctgccctggaacataggac	tagaaatcccgcacctgagt	catalase
CD14	EE818529 NM_001077209	gacccttcatggcttctttg	ttggttgatgtcctgggtct	CD14 molecule
CTGF	EE757904	agtccatcaaccccagacac	tctactggcctcctcccact	connective tissue growth factor
CXCL2	DY496264	ccgaagtcatagccactctt	ttggtgctgcccttgtttag	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
CXCL5	FE033277	tgcttgttcttgcagctttc	cagcattccagtcaaattcc	chemokine (C-X-C motif) ligand 5
CYR61	DQ239628	tcggaggtggagttaacgag	ctgggaccacgaagttgttt	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
DDIT4	EE826574	gtacgcacttgtcccaacag	caaggacgaggacgaagaag	DNA-damage-inducible transcript 4
EGR1	EE838247	actgcccgactgtactcaac	aaggcaccaagacgtgaaac	early growth response 1
GSTM3	DQ223552	taagaacaggctcacccaga	tgtccactcgaatcctttcc	glutathione transferase M3
IL1a	NM_001009808	gatgacctggaagccattgc	atgtgctgatctgggcttgat	interleukin 1, alpha
IL1b	NM_001009465	tgaagagctgcacccaacac	gagaaatctgcagctggatgttt	interleukin 1, beta
IL8	NM_001009401	cattgccacaaagcaagaaa	gcacaatcaaggctatttttcc	interleukin 8
LAMA3	EE782590	gaccgtctcaatctcaccaa	tgaatgaccacaggagacca	laminin, alpha 3
MAN1A1	EE789683	cctggcagtttacagagcttc	gcacaaacaaagagcaatgg	mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase
MYC	NM_001009426	gacacggaggagaatgacaa	gatctggtcacgaagagcaa	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
NFIL3	EE756836	gaacaagctctgggccttta	cagccttgcgatggactatt	nuclear factor, interleukin 3 regulated
PLAT	EE784649	gaagatggacaaacgccagt	tcgtgtgcatagaggaggaa	plasminogen activator, tissue

HGNC	Accession Number	PRIMER_F1_SEQ	PRIMER_R1_SEQ	Description
SAA3	EU366476 EE866720	aggctcttcagggaatcaca	gtcagccttcgtgtcctctc	serum amyloid A3
SLC2A3	NM_001009770	atgtcgcaggagaagcaagt	ctggagcatgatggagatga	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3
SOD2	EE760845	gtttctgagcgtggcttgtt	cgattgaccaggatggaaag	superoxide dismutase 2, mitochondrial
TNFa	NM_001024860	gagcaccaaaagcatgatcc	ggcgatgatcccaaagtaga	tumor necrosis factor alfa
VEGFA	EE772615	cgatgtcctcagaccattga	tgggttaaccactcacacacac	vascular endothelial growth factor A
GAPDH	HKG*	tgacaaagtggtcgttgagg	tggagaaacctgccaagtatg	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HRP	HKG**	tcctcatggactaattat	ccacccatctccttcatcac	
RLP19	HKG*	aagggcaggcatatgggtatag	gttaccttctcgggcattcg	receptor like protein 19
RLP26	HKG*	gttgtgccattcacagcaag	gtctaaatcggggtggaggt	receptor like protein 26
SDHA	HKG**	gtcaagactggggaggtca	gtcggtctcgttcaaagtcc	succinate dehydrogenase complex, subunit A
TYR	HKG*	gtcatcttggagggtcgtct	tcgagccatctgctgttttt	tyrosinase

* HKG: House keeping genes used for normalizing the other gene expression
** HKG tested but not used for normalization

Table 2: RT-qPCR of 17 differentially-expressed genes over time. RNA was quantified for Tref, T5Sa, T1Sp and T5Sp samples with Biomark Fuidigm® technology. The differences of gene expression over time between Tref *vs* T5Sa, Tref *vs* T1Sp, Tref *vs* T5Sp and T1Sp *vs* T5SP, and between stimulation conditions at T5 (T5Sa *vs* T5Sp) were computed using Wilcoxon non-exact tests for each gene. The mean value and the standard deviation are presented for each time point.

	Time				Stimulation	Tref		T1Sp		T5Sa		T5Sp	
Gene	p-value Tref-T5Sa	p-value Tref-T1Sp	p-value Tref-T5Sp	p-value T1Sp-T5Sp	p-value T5Sa-T5Sp	Mean	Sd	Mean	Sd	Mean	Sd	Mean	Sd
CD14	0.196	0.178	0.008	0.002	0.008	1.18	± 0.56	0.95	± 0.57	1.01	± 0.52	2.65	± 1.65
CTGF	0.011	0.474	0.002	0.004	0.137	1.44	± 1.17	1.65	± 1.49	0.55	± 0.41	0.42	± 0.29
CXCL2	0.112	0.051	0.021	0.459	0.514	1.26	± 0.43	3.21	± 2.79	2.92	± 2.52	2.58	± 1.57
CXCL5	0.423	0.43	0.009	0.003	0.021	1.24	± 0.68	1.12	± 0.57	1.48	± 1.07	3.95	± 3.39
CYR61	0	0.239	0	0.001	0.398	1.22	± 0.62	1.1	± 0.63	0.39	± 0.24	0.39	± 0.12
DDIT4	0	0.481	0	0	0.005	1.86	± 1.53	1.4	± 0.67	10.61	± 3.35	6.57	± 2.89
EGR1	0	0.17	0	0	0.141	1.02	± 0.49	1.46	± 0.84	0.19	± 0.14	0.24	± 0.16
IL1a	0.012	0.015	0.076	0.459	0.486	1.11	± 0.63	1.78	± 0.8	1.65	± 0.52	1.82	± 1.2
IL8	0.003	0.003	0.005	0.175	0.432	1.76	± 2.55	5.29	± 4.44	12.11	± 13.34	11.33	± 13.22
MAN1A1	0.2	0.244	0.102	0.018	0.026	0.83	± 0.36	0.73	± 0.49	0.69	± 0.38	1.62	± 1.09
MYC	0	0.027	0.044	0.302	0	1.2	± 0.36	0.91	± 0.34	0.43	± 0.17	0.95	± 0.31
NFIL3	0	0.468	0	0	0.122	1.24	± 0.56	1.15	± 0.39	3.23	± 0.91	2.86	± 1.4
PLAT	0.398	0.474	0.076	0.042	0.126	1.22	± 1.09	1.21	± 1.26	1.61	± 1.71	4.73	± 6.25
SAA3	0.003	0.121	0.001	0.01	0.279	3.8	± 8.27	3.28	± 2.8	16.91	± 17.73	50.44	± 85.53
SLC2A3	0	0.424	0.01	0.002	0.099	1.18	± 1.35	0.79	± 0.58	5.56	± 4.31	3.27	± 2.05
SOD2	0.333	0.072	0.069	0.004	0.138	1.49	± 1.13	0.56	± 0.4	1.96	± 2.08	4.29	± 4.97
VEGFA	0.012	0.038	0.001	0.001	0.112	1.07	± 0.43	0.82	± 0.5	1.98	± 1.04	2.64	± 1.61

Table 3: List of the differentially-expressed genes between resistant and susceptible animals. The selected genes have a Benjamini-Hochberg corrected p-value inferior of less than 5% (P_BH5) and a log ratio between resistant and susceptible animals greater than 0.58, i.e. a fold-change of 1.5 (n = 23 genes).

ProbeName	HGNC	description	LR	P_BH5
A_70_P016556	GSTM3	Glutathione S-transferase Mu 5	-1.36	0.0001
A_70_P016557	GSTM3	Glutathione S-transferase Mu 5	-1.34	0.0001
A_70_P053411	PLAT	plasminogen activator, tissue	-1.27	0.0004
A_70_P051106	SLC2A3	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	-0.88	0
A_70_P003541	SAA3	Serum amyloid A protein	-0.85	0.0048
A_70_P039662	IL8	Interleukin-8	-0.83	0.0049
A_70_P041692	VIM	Vimentin	-0.76	0.0016
A_70_P035536	ANKRD1	Ankyrin repeat domain-containing protein 1	-0.74	0.0052
A_70_P016606	PRDX1	peroxiredoxin 1	-0.74	0.0006
A_70_P051107	SLC2A3	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	-0.74	0
A_70_P039661	IL8	Interleukin-8	-0.72	0.0051
A_70_P026901	PLEKHB1	pleckstrin homology domain containing, family B member 1	-0.71	0.0034
A_70_P035621	CRIP1	Cysteine-rich protein 1	-0.7	0.0017
A_70_P065771	CYP1B1	similar to cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	-0.7	0.0002
A_70_P018256	S100A4	Protein S100-A4 OS=Bos taurus GN=S100A4	-0.69	0.0035
A_70_P019151	LAMA3	laminin, alpha 3	-0.69	0
A_70_P053606	MAN1A1	mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase	-0.65	0.0015
A_70_P051921	PPP1R15A	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A	-0.62	0.0001
A_70_P003061	OVUBQ-L40	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	-0.6	0.0013
A_70_P003062	FTH1	Ferritin heavy chain	-0.59	0.0001
A_70_P052621	PPA1	Inorganic pyrophosphatase	0.6	0.0012
A_70_P065551	PLET1	placenta-expressed transcript 1 protein	0.62	0.0018
A_70_P006016	CAT	Catalase	1.03	0.0002

Table 4: RT-qPCR of eight differentially-expressed genes between resistant and susceptible animals. MEC RNA was quantified for Tref, T5Sa, T1Sp and T5Sp samples with Biomark Fluidigm® technology. The differences of gene expression between resistant and susceptible animals were computed using Wilcoxon non-exact tests for each gene. The mean value and the standard deviation are presented for each animal group.

		Susceptible		Resistant	
Gene	P-Wilcox	Mean	Sd	Mean	Sd
CAT	0.00024	1.02	± 0.73	2.21	± 1.17
GSTM3	0.0045	1.18	± 0.96	0.31	± 0.14
IL8	0.12423	7.58	± 8.49	7.49	± 11.89
LAMA3	0.00404	1.22	± 0.51	0.8	± 0.41
MAN1A1	0.00007	1.3	± 0.74	0.63	± 0.53
PLAT	0.02985	2.37	± 3.47	1.9	± 3.48
SAA3	0.20784	15.71	± 29.8	19.93	± 56.46
SLC2A3	0.02671	3.56	± 3.87	1.86	± 1.86

Additional files

Additional File 1: List of the differentially-expressed genes in the time course with live S. aureus data. The genes were selected if the Benjamini-Hochberg corrected p-value was less than 5% (P_BH5) and the log ratio between two time-points (LRT1T0, LRT5T1, LRT5T0) was greater than 0.58 which corresponds to a fold-change of 1.5 (n = 531). The p-values of the t-test between each pair of time points are provided in the columns “Prob”.

Additional File 2: List of the differentially-expressed genes in the time course with S. aureus supernatant data. The genes were selected if the Benjamini-Hochberg corrected p-value was less than 5% (P_BH5) and the log ratio between two time-points (LRT1T0, LRT5T1, LRT5T0) was greater than 0.58 which corresponds to a fold-change of 1.5 (n = 687). The p-values of the t-test between each pair of time points are provided in the columns “Prob”.

Additional File 3: List of the differentially-expressed genes between cells stimulated with live S. aureus and supernatant at the 1-hour time point (n = 116). The genes were considered as significant if the p-value corrected by Benjamini-Hochberg was less than 0.05 (P_BH5) and the log ratio (LR) between live bacteria and supernatant was superior to 0.58 (i.e. fold-change greater than 1.5).

Additional File 4: List of the differentially-expressed genes between cells stimulated with live S. aureus and supernatant at the 5-hour time point (n = 44). The genes were considered as significant if the p-value corrected by Benjamini-Hochberg was less than 0.05 (P_BH5) and the log ratio (LR) between live bacteria and supernatant was superior to 0.58 (i.e. fold-change greater than 1.5).

4 Discussion

Des cellules épithéliales mammaires des brebis de la lignée résistante et des brebis de la lignée sensible ont été stimulées *in vitro* par *S. aureus* pour répondre aux deux objectifs fixés : i) analyser la réponse des CEM à une infection par *S. aureus* ou ses produits de sécrétion présents dans le milieu de culture et ii) identifier les différences d'expression entre les deux lignées à la suite des stimulations.

Tout d'abord, les stimulations *in vitro* des cellules épithéliales mammaires (CEM) par *S. aureus* vivant et son surnageant de culture ont été comparées. Alors que *S. aureus* vivant peut sécréter des toxines et se multiplier, le surnageant de culture contient des produits de sécrétion qui sont moins agressifs et dégradent moins les CEM cultivées ; il ne se multiplie pas, ainsi la quantité de stimulation n'évolue pas au cours du temps. Globalement, les deux stimulations ont entraîné une diminution du métabolisme cellulaire, de grandes modifications des voies associées à la mort cellulaire et à sa régulation, ainsi que de fortes modifications de l'expression associée aux réponses inflammatoire et immunitaire. Toutefois, seulement la moitié des gènes différentiels au cours du temps était commune aux deux stimulations. Ainsi la stimulation des CEM par des PAMP sécrétés n'implique pas exactement les mêmes réponses des cellules de l'hôte qu'une infection par une bactérie vivante.

Lors de la comparaison des CEM des brebis de la lignée résistante et des CEM des brebis de la lignée sensible, un petit nombre de gènes (n=20) a été identifié comme différemment exprimé entre les lignées, avec trois gènes plus fortement exprimés dans les CEM des brebis de la lignée résistante, dont la catalase (*cat*), qui a un rôle cellulaire anti-oxydant qui protège les cellules contre les effets délétères de *S. aureus* (Martinez-Pulgarin et al. 2009; de la Fuente et al. 2010). L'analyse des réseaux de gènes a permis de regrouper quinze gènes différentiels autour du facteur de transcription TP53 qui est connu pour son rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire et qui est très étudié dans le cadre du cancer, et des gènes NFκB et MYC qui jouent des rôles importants dans les processus inflammatoires. Le facteur de transcription NFκB est activé par la voie des TLR et il conduit à l'activation de différents gènes inflammatoires et permet l'activation de la réponse susceptible d'éliminer l'agent infectieux (Doyle et O'Neill 2006). Il peut également activer MYC (Duyao et al. 1992) et son interaction avec P53 peut jouer un rôle charnière dans la détermination de la réponse cellulaire au stress (Tergaonkar et Perkins 2007).

En parallèle de nos travaux, des chercheurs allemands ont réalisé une étude similaire utilisant des vaches sélectionnées soit sur l'index SCS, soit sur un QTL associé à la prédisposition aux mammites et localisé sur le chromosome bovin BTA18. Des cultures primaires de CEM de deux groupes de vaches ont été stimulées pendant une durée maximale de 24h avec *S. aureus* (Griesbeck-Zilch et al. 2009; Brand et al. 2011). Dans un premier temps, les auteurs ont mesuré l'expression de quelques cytokines dans les deux groupes d'animaux par RT-qPCR (Griesbeck-Zilch et al. 2009), puis de façon élargie à l'aide d'un microarray (Brand et al. 2011). Dans cette deuxième étude, ils ont comparé le profil d'évolution des gènes dans le temps chez les vaches résistantes et les vaches sensibles. Ainsi, leur étude et la nôtre ne sont pas directement comparables, mais parmi les 20 gènes que nous avons identifiés, quatre sont présents dans la liste de l'équipe allemande après stimulation par *S. aureus* (*il8, saa3, slc2a3* et *ppp1r15a*) ainsi que des sous-unités de NFκB. Dans notre étude, ces quatre gènes sont plus fortement exprimés dans les CEM des brebis de la lignée sensible d'après les résultats de l'analyse microarray, mais les gènes *il8* et *saa3*, dont le rôle respectivement dans le recrutement des neutrophiles (Vetillard et al. 1999) et comme marqueur de l'inflammation (Weber et al. 2006) sont bien connus, n'ont pas été confirmés par RT-qPCR. L'équipe allemande a montré récemment, qu'après stimulation par *S. aureus,* les

sous-unités NFκB1, NFκB2, NFκBIA et NFκBIE sont activées au cours du temps uniquement chez les vaches résistantes, sauf pour NFκBIA qui est très légèrement activé chez les vaches sensibles (Brand et al. 2011). Même si ce gène n'était pas différemment exprimé entre les brebis de la lignée sensible et résistantes, nous avons montré qu'il était fortement associé à ces gènes-là. Cette observation renforce l'idée que les processus inflammatoires sont primordiaux dans la réponse des CEM à *S. aureus*. Dans l'analyse des CEM bovines, les gènes *slc2a3* et *il8* étaient activés uniquement dans les CEM des vaches sensibles (Brand et al. 2011). Par conséquent, nos résultats et ceux du groupe allemand semblent montrer une expression supérieure des gènes *slc2a3* et *il8* chez les animaux sensibles aux mammites par rapport aux résistants. Cependant, ils avaient montré précédemment une surexpression d'*il8* dans les CEM des vaches résistantes (Griesbeck-Zilch et al. 2009) ce qui semble en opposition aux nouveaux résultats (Brand et al. 2011).

Ils ont aussi montré que les gènes *saa3* et *ppp1r15a* sont activés au cours du temps uniquement dans les CEM des vaches résistantes, alors que nous avons montré une expression supérieure de ces gènes dans les CEM des brebis de la lignée sensible. Deux hypothèses peuvent être formulées : i) les vaches et les brebis, bien que phylogénétiquement proches, ont des capacités de réponse à ces pathogènes qui sont légèrement différentes, ii) les vaches ont été sélectionnées selon l'allèle à un QTL alors que les brebis ont été sélectionnées sur le score de cellules somatiques. Bien que ces deux phénotypes soient associés à des formes de résistance aux mammites, ces deux choix n'opèrent pas sur les mêmes mécanismes génétiques, ce qui explique les divergences des résultats observés.

En conclusion, les cellules épithéliales mammaires des brebis de la lignée résistante et celles des brebis de la lignée sensible expriment peu de différences en réponse à la stimulation par un pathogène majeur comme *S. aureus*, mais il semblerait que l'interleukine 8 qui a un fort pouvoir d'attraction des neutrophiles soit plus exprimée dans les CEM des brebis de la lignée sensible (même si ce résultat n'est pas confirmé en RT-qPCR) et que les principales voies qui différencient les deux lignées de brebis sont en relation directe avec l'inflammation.

PARTIE 4 : META-ANALYSE DES DONNEES TRANSCRIPTOMIQUES REALISEES A PARTIR DES CELLULES DE BREBIS SELECTIONNEES SUR LA RESISTANCE AUX MAMMITES

1 Contexte et objectifs

Principaux résultats et discussion des trois analyses transcriptomiques indépendantes

La recherche de gènes différentiels à travers les trois analyses précédentes a permis d'identifier des mécanismes qui sont activés ou réprimés spécifiquement chez les brebis de la lignée résistante ou chez les brebis de la lignée sensible dans plusieurs types de cellules supposés participer à la réponse vis-à-vis des agents pathogènes mammaires. L'analyse des CSL a mis en évidence une meilleure détection des agents pathogènes *via* la voie du TLR2 dans les CSL des brebis de la lignée résistante. Le renouvellement cellulaire semblait plus élevé dans les CSL des brebis de la lignée résistante, avec une meilleure adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales lors de la diapédèse et avec des phénomènes apoptotiques et granulopoïétiques plus activés. Dans les cellules dentritiques (CD), la voie du complément qui a des activités bactéricides et celle de IDO1 qui dirige la différenciation de cellules T régulatrices et limite l'inflammation, sont favorisées dans les CD des brebis de la lignée résistante. En revanche quelques gènes impliqués dans le recrutement des neutrophiles sont plus exprimés dans les CD des brebis de la lignée sensible. En ce qui concerne les cellules épithéliales mammaires (CEM), peu de gènes différentiels ont été identifiés. Mais ils sont en relation avec les processus inflammatoires, qui semblent un peu plus importants dans les CEM des brebis de la lignée sensible que chez les résistantes. De plus la principale cytokine qui recrute les neutrophiles (IL8) semble plus exprimée chez les brebis de la lignée sensible, ce qui n'est pas confirmé par RT-qPCR, mais qui est cohérent avec une étude similaire (Brand et al. 2011).

Ainsi les résultats des trois analyses transcriptomiques ont identifié des gènes différentiels entre les lignées et mis en évidence des mécanismes susceptibles d'expliquer les différences des réponses entre les lignées ; la plupart est spécifique du type cellulaire considéré. Cependant, certains résultats conduisent à des interprétations opposées. En effet les données obtenues avec les neutrophiles suggèrent une migration du sang vers la citerne mammaire et le lait plus efficace dans la lignée résistante (étude des CSL), alors que les cellules dendritiques et les cellules épithéliales semblent plutôt indiquer que le recrutement des neutrophiles est plus marqué dans la lignée sensible.

Objectif et plan

Les objectifs de la méta-analyse sont de confronter les résultats des trois analyses indépendantes, de les regrouper dans une analyse commune afin d'identifier des profils d'expression communs. Ainsi, par la répétition des mesures, nous faisons l'hypothèse que les résultats d'une méta-analyse conduiront à l'obtention de résultats plus robustes, et éventuellement nouveaux par rapport aux études indépendantes.

Même si nous avons choisi, par simplification, d'étudier la réponse d'un type cellulaire pris isolément plutôt que la réponse du tissu au contact du pathogène, cette approche est réductionniste. En effet, les cellules d'un organisme pluricellulaire agissent de façon plus

ou moins coordonnée au sein d'un tissu, mais aussi entre les organes. Les analyses réalisées jusqu'alors, à l'exception des cellules du lait, ont ignoré les interactions cellulaires.

Aussi, il nous a semblé intéressant de comparer les **profils géniques exprimés par les cellules dendritiques, les cellules du lait et les cellules épithéliales mammaires** afin d'identifier des gènes dont le profil d'expression serait communément régulé en réponse à la stimulation par un staphylocoque dans l'objectif d'accroître la connaissance des mécanismes cellulaires de réponse aux infections chez les brebis de la lignée résistante et chez les brebis de la lignée sensible. L'étude conjointe des trois analyses nous permet aussi de **pallier partiellement à la limite des faibles effectifs au sein de chaque analyse indépendante.**

Dans un premier temps, les listes de gènes différentiels de chaque analyse indépendante ont été regroupées et la méta-liste obtenue a été interprétée. Dans un second temps, des analyses statistiques plus complexes ont été effectuées pour analyser les données conjointement dans une méta-analyse.

Ces méta-analyses ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe d'Alessandra Stella (Parco, Tecnologico Padano).

La deuxième méta-analyse qui porte sur l'analyse de réseaux de gènes est une approche exploratoire. Elle n'a pas pour vocation de donner une vue exhasutive de l'ensemble des informations qui peuvent être extraites des trois jeux de données, mais elle permet d'approcher l'évolution dans le temps des gènes en relation avec la différence de sensibilité aux IMI. Pour compléter ces analyses il serait intéressant de considérer les cinétiques d'activation ou de répression de gènes avec des approches plus dynamiques.

Interprétation de la méta-liste regroupant les trois analyses monocellulaires

Dans cette première approche, nous avons fusionné les listes de gènes différentiels pour les cellules du lait, les cellules dendritiques et les cellules épithéliales mammaires chez les brebis de la lignée résistante et chez les brebis de la lignée sensible, en jouxtant simplement les résultats des différences entre lignées obtenus dans chacune des trois études précédentes. Ainsi, ces analyses ont porté sur douze brebis de la lignée résistante et treize brebis de la lignée sensible.

Nous avions réalisé les analyses statistiques des données de transcriptome pour les CSL et les CD avec le logiciel GeneSpring®, qui est un logiciel commercial qui permet d'analyser rapidement et facilement des données lorsque le dispositif expérimental est simple. En revanche pour les CEM pour lesquelles le schéma expérimental est plus complexe (5 conditions différentes avec deux stimulations et trois temps d'analyse différents), nous avons utilisé les logiciels R (package LIMMA) et SAS qui ont une plus grande souplesse d'utilisation et permettent de prendre en compte des dispositifs plus complexes. Dans les trois analyses i) nous avions corrigé les p-values obtenus par la procédure de Benjamini-Hochberg (BH) afin de diminuer le taux de faux positifs et ii) nous avions fixé arbitrairement un seuil de variation d'expression supérieur à 50%, soit un rapport de 1,5 du niveau d'expression d'un gène entre les deux lignées de brebis. Pour les données des CSL et des CEM, les gènes significatifs étaient peu nombreux en appliquant un seuil de 5% à la procédure de BH (57 et 23, respectivement). En revanche pour les analyses des CD, 719 gènes étaient significatifs, ce qui rendait complexe l'interprétation de cette liste. Pour diminuer artificiellement le nombre de gènes, nous avons choisi, de fixer le seuil de faux positifs à 1% ; ainsi, la liste obtenue a été réduite à 204 gènes pour les analyses de fonction. Nous avons constaté que les analyses fonctionnelles donnaient des résultats plus souvent interprétables lorsqu'on utilise un petit

nombre de gènes différentiels, en abaissant le plus possible le taux de résultats faussement positifs.

Nous avons rassemblé dans une méta-liste les 57, 204 et 23 gènes différemment exprimés entre les brebis de la lignée résistante et les brebis de la lignée sensible, qui avaient respectivement été identifiés lors des analyses des CSL, des CD et des CEM (Chapitres III, Parties I, II et III). Parmi les 284 gènes, 5 appartiennent aux listes de gènes différentiels entre lignées pour les CSL et les CD et 2 appartiennent à celles des CD et CEM (Figure 11). Ainsi aucun gène n'est commun à toutes les analyses, et très peu sont partagés, si les analyses sont considérées deux à deux. Cette observation peut s'expliquer par des fonctions biologiques assez différentes entre les trois types cellulaires étudiés, ou par le fait que l'analyse statistique ne retient que les gènes qui sont les plus différemment exprimés entre lignées et de façon spécifique à un type cellulaire donné.

Pour obtenir plus d'information sur les différences entre lignées, nous avons analysé les fonctions biologiques et les voies les plus représentées dans la méta-liste, et effectué des analyses de réseaux de gènes. Les résultats de cette analyse ont été présentés sous forme d'un poster (Annexe 1) (Bonnefont et al. 2010).

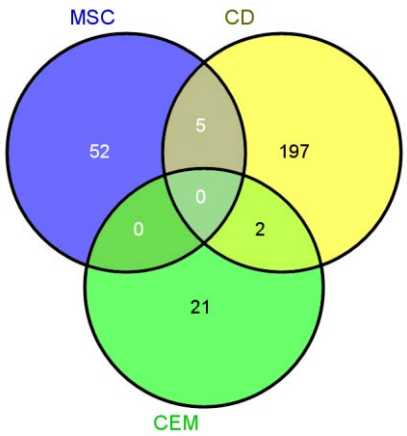


Figure 12 : Diagramme de Venn entre les trois listes de gènes différentiels entre lignées obtenus avec les CSL, CD et CEM

Les principaux résultats des analyses avec le logiciel IPA confirment les différences de diapédèse entre les lignées (« *leukocyte extravasation signalling* »), avec à la fois des gènes surexprimés chez les brebis de la lignée résistante (CLDN4, CLDN5, ACTN4 et MMP12) et d'autres surexprimés chez les sensibles (ICAM1, ICAM3, VAV1, MMP9). De plus les processus inflammatoires de la phase aigüe (« *acute phase response signalling* » SAA3, FN1, TF, MYD88, CRABP1 et IL1RAP) sont plus activés chez les brebis de la lignée sensible que chez les brebis de la lignée résistante après stimulation par *Staphylococcus* (Annexe 1) (Bonnefont et al. 2010).

De plus, l'analyse IPA des réseaux de gènes a permis de mettre en évidence une certaine cohérence entre les gènes différentiels appartenant aux trois analyses, car une grande partie de ceux-ci est regroupée dans un même réseau fonctionnel. On peut interpréter cette union entre les gènes différentiels comme un fonctionnement coordonné des trois types cellulaires.

Par ailleurs, le réseau met en évidence le rôle central du gène codant pour le facteur de transcription TP53, qui est plus exprimé dans les CSL des brebis de la lignée résistante que

dans celles des brebis de la lignée sensible et qui interagit avec un grand nombre de gènes, dont une partie est exprimée différemment entre les lignées.

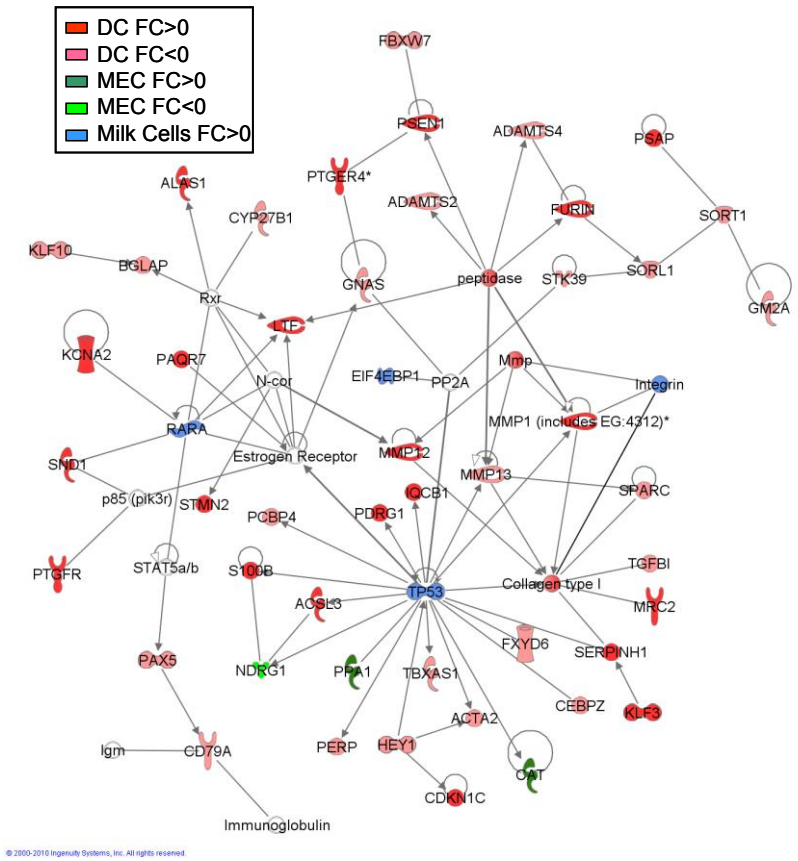


Figure 13 : Réseau de gènes obtenu avec Ingenuity (IPA) qui regroupe les gènes différentiels dans chacune des analyses (CSL, CD et CEM)

Les analyses des fonctions GO avec le logiciel DAVID ont montré que la plupart des fonctions biologiques associées aux différences entre les brebis de la lignée résistante et les brebis de la lignée sensible est en relation avec la réponse inflammatoire (« *response to wounding, response to organic substance, immune response, inflammatory response, innate immune response* »). Entre 13 et 40 gènes appartiennent à ces différentes catégories et la plupart est plus exprimée chez les brebis de la lignée sensible que chez les brebis de la lignée résistante.

Ainsi, l'analyse fonctionnelle de la méta-liste a permis de confirmer les résultats déjà obtenus dans les analyses indépendantes, à savoir une régulation différente de la diapédèse entre les deux lignées de brebis et une augmentation de la réponse inflammatoire chez les brebis de la lignée sensible. Cependant elle n'a pas apporté d'éléments nouveaux sur le recrutement des neutrophiles, ou un autre mécanisme.

2 Résumé

Pour examiner en même temps les trois profils d'expression cellulaire (entre CSL, CD et CEM) et identifier des différences entre lignées, nous avons analysé les données des

analyses microarray par deux méthodes différentes. Tout d'abord, nous avons fait une analyse de variance globale en considérant toutes les données simultanément de façon à augmenter la puissance statistique des tests. Puis nous avons analysé l'évolution de l'expression des gènes dans le temps en regroupant les gènes dont l'expression est corrélée au sein des CD et CEM. Cette analyse n'a pas pu être effectuée sur les CSL car nous ne disposions que d'un seul temps de prélèvement.

ANOVA globale des profils d'expression

Les données brutes d'intensité de toutes les observations ont été importées dans R (package LIMMA) ; toutes les sondes avaient deux valeurs pour les deux couleurs. Le pré-traitement des données a été effectué en trois temps. Tout d'abord nous avons appliqué une normalisation Loess pour chaque array afin de corriger le biais lié au fluorochrome (Couleur). Puis nous avons effectué une normalisation par quantiles entre les arrays pour chaque type cellulaire afin de corriger les biais de l'hybridation, puis nous avons appliqué une deuxième fois cette normalisation à l'ensemble des lames pour corriger les différences liées au type cellulaire et à l'essai. Les données ainsi préparées ont été analysées avec le logiciel SAS en utilisant le modèle ci-dessous qui permet d'isoler les différences entre lignées tout en corrigeant les données pour tous les autres paramètres disponibles :

$$y = \mu + Lignée + Cellule + Pathogène + Etat(Pathogène) + Temps(Cellule) + Couleur$$

Où *Lignée* représente la lignée, *Cellule* le type cellulaire (CD, CEM, CSL), *Pathogène* le germe inoculé (*S. aureus, S. epidermidis*), *Etat(Pathogène)* la nature de la stimulation (bactérie vivante, incativée par la chaleur, surnageant de culture), *Temps(Cellule)* la durée de stimulation (T0, T1, T3, T5, T8, T12) et *Couleur* le fluorochrome incorporé (Cy3, Cy5).

Après une correction de BH à 5%, 509 gènes différentiels ont été identifiés entre les deux groupes de brebis. Les données étant issues de plusieurs types cellulaires et le niveau d'expression d'un gène variant en fonction du type cellulaire, nous avons choisi de ne pas appliquer de seuil sur le rapport d'expression entre lignées pour la sélection des gènes, car cela pourrait masquer des phénomènes intéressants passés jusque-là inaperçus.

Parmi les dix gènes significatifs avec une expression plus élevée chez les brebis de la lignée résistante, il y a quatre gènes du CMH, un peptide antimicrobien (*sc5*, aussi appelé *camp*), *pept1* et *cat* déjà présents dans les CEM, *mmp12* identifié dans les CD et *rpl39*. Dans la liste des dix gènes les plus exprimés chez les brebis de la lignée sensible, on trouve un gène du CMH, deux trancripts de *gstm3* déjà identifiés dans les CEM et les CD, *tmem87b* et *mapre1* dans les CSL et les CD, *cpb2* dans les CSL, *cyp1b1* dans les CEM et *tfp12*.

Les principales voies dont l'expression est modifiée sont l'adhésion au collagène via Gp IV, l'expression des gènes régulés par PERK et les voies liées au facteur de transcription AHR et celles du stress du réticulum endoplasmique.

Les principales fonctions modifiées sont la réponse inflammatoire, la mort cellulaire, l'hématopoïèse et la circulation des cellules immunitaires. Parmi les 509 gènes différentiels, 54% sont plus exprimés chez les brebis de la lignée résistante en relation avec la voie de NFκB ; et 46% sont plus exprimés chez les brebis de la lignée sensible avec la voie de signalisation de la cytokine anti-inflammatoire IL10 et de SODD/TNFR1, la régulation des cellules T CD4+ par les macrophages et l'activation alternative des cellules présentatrices d'antigènes.

Méta-analyse : analyse de réseaux de gènes

Pour préciser les variations d'expression des gènes différentiels au cours du temps, nous avons voulu considérer le facteur temps dans l'analyse des réponses. Les données des CD et des CEM ont été seules prises en compte car elles proviennent d'une étude avec une cinétique de trois points, contrairement aux données des neutrophiles du lait, qui ont été écartées.

La préparation des données brutes et les analyses statistiques ont été réalisées avec R (package LIMMA), puis SAS pour homogénéiser les méthodes avec les analyses des CEM. Après la préparation des données dans R, les données normalisées ont été importées dans SAS. Les observations des brebis de la lignée résistante et celles des brebis de la lignée sensible ont été considérées séparément. Puis une analyse de variance de l'effet « temps » a été réalisée selon les modèles suivants :

Pour les CD : $y = \mu + Temps + Couleur$

Pour les CEM : $y = \mu + Temps + Etat\ pathogène + Couleur$

Où *Temps* correspond à la durée de stimulation, *Couleur* au fluorochrome incorporé (Cy3, Cy5) et *Etat pathogène* à la nature da la stimulation (bactérie vivante, surnageant de culture).

Ainsi nous avons pu obtenir les p-values de l'effet temps pour chaque gène et pour quatre jeux de données (deux lignées et deux types cellulaires). Seuls les gènes qui étaient présents dans les deux analyses (il y avait une étape préalable de filtrage des données avant la normalisation) ont été conservés pour la suite des analyses (n=4020). Puis les p-values ont été importées dans le logiciel Biolayout qui permet de regrouper des gènes dont la p-value de l'effet *Temps* est corrélée. Cinquante quatre clusters ont ainsi été générés. Les clusters qui contenaient des gènes fortement co-régulés dans les CD et CEM des brebis de la lignée résistante (n=662 gènes) et les brebis de la lignée sensible (n=131) ont été regroupés pour l'analyse. Les gènes retenus peuvent être faiblement ou fortement exprimés selon, mais la p-value de l'effet *Temps* est liée dans les deux populations cellulaires.

Les 662 gènes fortement regroupés chez les brebis de la lignée résistante interviennent principalement dans les voies métaboliques de TP53, TNFα, TGFβ, IFNγ, les cascades de signalisation de ERK et AKT, les caspases et les événements de la voie de signalisation de *cxcr4*. Les fonctions correspondantes sont les mécanismes de réponse aux infections, la mort cellulaire, la circulation des cellules immunitaires, le cycle cellulaire, la synthèse protéique et les modifications post-traductionnelles.

De façon intéressante, le facteur de transcription AHR qui est moins exprimé chez les brebis de la lignée résistante peut reconnaître et se lier à 114 des 662 gènes regroupés ensemble chez les brebis de la lignée résistante, soit 17%.

Pour les 131 gènes qui sont regroupés chez les brebis de la lignée sensible, les voies métaboliques de la phagocytose à travers la reconnaissance des récepteurs Fcγ, celles du cycle cellulaire et de l'organisation cellulaire et celle de l'hématopoïèse sont communes.

3 Article 4

Meta-analysis of transcriptomic data from sheep selected on mastitis resistance

Bonnefont CMD, …

Article en préparation

Meta-analysis of transcriptomic data from sheep selected on mastitis resistance

Cécile MD Bonnefont

Abstract

Abbreviations:

MSC: milk somatic cells

BMDC: bone-marrow derived dendritic cells

MEC: mammary epithelial cells

DEG: differentially expressed genes

Introduction

Selection of dairy cattle for improving their productive capacity has been tremendously effective, but it has probably enhanced their predisposition to infectious disease, as increase of clinical and subclinical mastitis has been reported (11, 15). Indeed, several attempts for diminishing mastitis occurrence by using a combination of preventive and curative measures were implemented and imorved the situation (33). To improve mammary health further, genetic selection is now considered in the dairy industry.

For establishment of genetic selection on mastitis resistance, it is mandatory to have access to a parameter that is easy and cheap to measure, widely available, and well correlated with both clinical and subclinical mastitis. When a healthy udder becomes infected by bacteria, numerous cells are recruited in the mammary gland and the milk leading to highly increased somatic cell counts (SCC) (16, 26). Most estimates of genetic correlation between somatic cell score (SCS, the log-value of SCC) and clinical mastitis range from 0.3 to 0.8 with an average of 0.7 (3, 8, 11, 19, 21, 29, 30). Genetic correlation between SCS and bacterial infection was estimated to be near unity (40), indicating that SCS and subclinical infections are essentially the same trait (30). Thus, it is largely used in dairy selection for improving mastitis resistance. Its heritability estimates is 0.15 in average in dairy cattle (10, 21, 29) and from 0.11 to 0.14 in dairy sheep (review Rupp et al, 2010).

However the genes and mechanisms that confer mastitis resistance associated with SCS selection are poorly known. Many QTL for mastitis resistance have been identified in dairy cattle (17, 24) and sheep (29, 31), but the underlying mechanisms are not identified except for one QTL. Sugimoto *et al.* (2006) displayed the role of a QTL involved in mastitis resistance. They showed that a three-base insertion in a glycine-coding stretch of the gene for forebrain embryonic zinc finger-like (FEZL) enhanced mastitis susceptibility in cattle. In resistant cows, the expression of FEZL was higher and promotes the expression of the axon-attracting molecule semaphorin 5A (SEMA5A) that induces expression of at least nine genes related to the host's immune response, including TNF-α and IL-8 (37). .

To provide enhanced insight into the genetic mechanisms involved in SCS-based selection, a divergent selection based on extreme breeding values for the somatic cell score (SCS) has been implemented (28). Previous studies indicated that the Low SCS ewes show a lower frequency of infection in natural conditions (28) and a lower bacteriological count after experimental infection (4). Gene expression of infected milk somatic cells (MSC) (4), bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) (39) and mammary epithelial cells (MEC) (Bonnefont et al, submitted) after *Staphylococcus* challenges has already been studied between groups of sheep from the two divergent lines using microarray analysis. The differences between resistant and susceptible sheep was higher in BMDC with 204 differentially-expressed genes (DEG) than in MSC with 52 DEG and much more than in MEC with 22 genes, with 52, 63 and 14% of genes more expressed in resistant animals than in susceptible animals, respectively.

The aim of this study is to gather microarray data of the three experimental sets to highlight the main genes and mechanisms that are different between the SCS groups. Here, we present the results of the meta-analysis that show that the IL10 anti-inflammatory pathway and TNF pathway which are known in immune response against *Staphylococcus spp* were more up-regulated in susceptible than in resistant animals, and for the first time it was shown that the down-regulation of *ahr* was well associated with a lower susceptibility to mastitis in dairy ruminants

Material and methods

Microarray data

Two groups of Lacaune sheep were generated from divergent selection based on extreme breeding values for the SCS (28).

Three experiments were previously published after *Staphylococcus* challenges of three different cell types. Details of these experiments are presented in Table 1**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**. First, 2*6 animals were challenged *in vivo* by *S. epidermidis* and then by *S. aureus* and the infected milk somatic cells were collected 12h later (4). Then, two experiments were managed *in vitro*, using bone-marrow derived dendritic cells (n= 2*4 animals, part of the animals of the first experiment) (39) and mammary epithelial cells from 2*6 animals (independent from the other experiments) (Bonnefont et al, submitted) were challenged with Pansorbin, and *S. aureus* live bacteria or its culture supernatant, respectively. In the three experiments, the ovine oligonucleotide microarray was used (ref 019921, Agilent Technologies) in two-colour hybridization designs. The protocol was described previously (4, 5, 39). The dataset are publically available in the GEO database (Table 1). The ovine slide is composed of 15,008 probes, only 8,547 genes have a Human ortholog Gene Nomenclature Committee (HGNC) annotation (http://www.sigenae.org/, sheep oligo annotation version 7 of 2011/03/02) (9). We obtained additional information on un-annotated probes using the Basic Local Alignment Search Tool programme on the NCBI website (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) and using the ENSEMBL website (http://www.ensembl.org/index.html).

Meta-analysis of transcriptomic data

Comparison of the resistant and susceptible animals in the three experiments

The microarray data were prepared with the R software (v.2.9.0) in the package LIMMA. The raw data extracted with the Agilent's Feature Extraction software were imported. Each dataset was first normalized within array with the Loess procedure to correct the bias of labelling, and between arrays with the quantile method to correct the bias of hybridization. Then, the three datasets were gathered together and normalized between arrays again with the quantile method to homogenize the data between the three datasets.

Then the statistical analyses were performed gene by gene with SAS (version 9.1) using the SAS MIXED procedure with the following model:

$$y = \mu + Line + Cell + Pathogen + State(Pathogen) + Time + Color$$

where y is the $\log_2$-intensity of gene expression; *Line* is either resistant or susceptible; *Cell* can be milk somatic cells (MSC), bone marrow-derived dendritic cells (BM-DC) or mammary epithelial cells (MEC); *Pathogen* is either *S. aureus (Sa)* or *S. epidermidis (Se)*; *State(Pathogen)* was the nature of the pathogen : live bacteria, supernatant culture, or heat-killed *S. aureus* (HK-Sa) ; *Time* is the delay after exposure to the pathogen in hours; and *Color* is the dye, either Cy3 or Cy5.

The p-values of the *Line* effect were corrected for the multiple tests with the procedure of Benjamini-Hochberg at 5% –BH5– (2)

Comparison of the gene evolution in resistant and susceptible animals

In the DC and MEC experiments, the cells were collected at three time points: just before the inoculation, in the early phase (3 and 1 hours after exposure, respectively) and in the later phase (8 and 5 hours after exposure, respectively) for the microarray analysis. Gene evolution in the time course of the challenge could be analyzed separately in the resistant and the susceptible sheep group. So each dataset was divided into two groups in function of the animal status. Four datasets were obtained:

dataset 1: DC samples of the resistant animals

dataset 2: DC samples of the susceptible animals

dataset 3: MEC samples of the resistant animals

dataset 4: MEC samples of the susceptible animals.

Previously microarray data pre-processing was performed with the package LIMMA of R, but contrary to the first experiment the raw data were filtered on their level of intensity in each DC or MEC dataset separately, to eliminate the badly and weakly hybridized genes. A total of 10845 and 4225 genes were conserved for further analysis for dendritic and mammary epithelial cells, respectively. A subset of 4220 genes belonged to both datasets.

Then the SAS MIXED procedure was used gene by gene in the four datasets to compute the p-values of the time effect. The model were as following :

For DC : $y = \mu + Time + Color$

For MEC : $y = \mu + Time + PathogenState + Color$

where *Time* corresponded to the duration of the stimulation, *Color* the fluorochrome (Cy3, Cy5) et *PathogeneState* the nature of the stimulation (live bacteria, or supernatant).

The p-values of the 4020 probes that belonged to both DC and MEC data sets were saved as an ".expression" file. Following import into Biolayout Express^{3D}, v2.1 (38) a pairwise Pearson correlation matrix was calculated thereby performing an all *vs* dataset 1 comparison of the p-value of the time effect of each probe. Based on a user defined threshold of $r = 0.95$, an undirected network graph of the data was generated. In this context nodes represent genes and the edges between them Pearson correlation coefficients above the selected threshold. The resulting graph was large and highly structured. The network was then clustered into groups of genes sharing similar profiles using the MCL algorithm with an MCL inflation value (which controls the granularity of clustering) set to 3. The graph of the combined datasets was explored extensively in order to understand the significance of the gene clusterings and the functional activity of the cell populations investigated. The profile of the gene correlations between the four datasets was observed for each cluster. It allowed determining which clusters contained genes whose p-values of the time effect was highly correlated in the DC and MEC of the resistant animals which were gathered into a super-cluster A and genes whose p-values of the time effect was highly correlated in the DC and MEC of the susceptible animals in the super-cluster B.

Cluster biological interpretation

The genes from each super-cluster and the significant genes from the analysis of variance were analyzed with InnateDB to find enriched pathways and transcription factors that can regulate them (www.innatedb.com/). They were first annotated by ENSEMBL (http://www.ensembl.org/index.html) and the files with p-values and annotations were imported in InnateDB. The hypergeometric algorithm was applied to the data and the p-values were corrected by Benjamini-Hochberg at 5%. The pathways were also analyzed from the BIOCARTA and BBID databases available on the DAVID website (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, v6.7, http://david.abcc.ncifcrf.gov/). The functions of the genes were analyzed with Ingenuity Pathway Analysis (www.ingenuity.com). The functions were considered as significant if the corrected p-values were inferior to 0.05.

Results

ANOVA

The cellular functions in the divergent sheep lines in response to different *Staphylococcus* challenges were explored through gene expression profiling. The gene by gene ANOVA identified 509 differentially-expressed genes (DEG) between the resistant and the susceptible animals (corrected p-value <0.05) (Supplemental data 1). Among these, 276 genes were more expressed in the resistant animals than in the susceptible ones, and 233 were less expressed. The ten up and down genes were presented in the Table 2. Five transcripts belonged to the major histocompatibility complex (MHC) with four and one genes up in resistant and susceptible animals, respectively. The genes *sc5,* two transcripts of *pept1, mmp12, rpl39* and *cat* were more highly expressed in resistant animals, whereas two transcripts of *gstm3, tmem87b, cpb2, mapre1, tfp12* and *cyp1b1* were more highly expressed in susceptible animals (Table 2). The $\log_2$-ratio between resistant and susceptible animals were low, the maximum one was 1.06 (Supplemental data 1), which corresponds to a gene expression difference of 50%.

The pathway analysis of this gene list with the InnateDB online sofware showed two statistically significant pathways: the collagen adhesion via Gp IV (*cd36, col1a1* and *col1a2*; corrected p=0.01) and the PERK (ERK1 and ERK2) regulated gene expression (*atf3, atf4, eif2ak3* and *hspa5*; corrected p=0.038) (Table 3). The Caspase3 activation signaling in Fas and TNFR1 signaling pathways (*casp3* and *casp8*; p=0.002), the Il-10 anti-inflammatory signaling pathway (*hmox1, il10* and *il1a*; p=0.005), the TNFR1 signaling pathway (*casp3, casp8* and *birc3*; p=0.010) and the TNF receptor signaling pathway (*birc3, casp8, map4k2* and *sqstm1*; p=0.034) were also of major importance (Table 3). The IL-10 Anti-inflammatory Signaling Pathway and the SODD/TNFR1 Signaling Pathway were confirmed with BIOCARTA pathways with a fold enrichment of 13.6 and 10.2, respectively (Table 3). With Ingenuity Pathway Knowledge Base (IPKB), the aryl hydrocarbon receptor (AHR) (n=11 genes, p<0.001), the endoplasmic reticulum stress pathway (n=4; p<0.001) and TNFR1 pathway (n=6, p< 0.001) were also significant (Table 3).

All the genes involved in these pathways were more expressed in the susceptible animals than in the resistant ones, except for AHR in which three of the eleven genes up-regulated in resistant animals (*tp53, myc* and *aldh18a1*) were involved in (Table 3). The pathways were also analyzed inside the list of the genes more expressed in the resistant animals when compared to the susceptible ones and the NFkB pathway was well represented in reference to the BBID database (*tp53, myc* and *traf5*; p=0.028); and then inside the list of the genes less expressed in the resistant animals the IL-10 anti-inflammatory signaling pathway and SODD/TNFR1 signaling pathway (fold enrichment = 25.5) were confirmed in reference to the BIOCARTA database (fold enrichment = 19.2) and the macrophage regulation of CD4+ T cells (fold enrichment = 10.7; p=0.023) and alternatively activated antigen presenting cell (fold enrichment = 9.8; p=0.028) with the genes *il10, il1a* and *tnfa* were also well represented in reference to the BBID database (Table 3).

The main biological functions with the IPKB were the inflammatory response (n=58 genes; corrected p=0.002) and inflammatory disease (n=103; corrected p=0.002) in the disease and disorder categories; cell death (n=101; corrected p=0.002) in the molecular and cellular functions; hematopoiesis (n=16 genes; corrected p<0.001), immune cell trafficking (n=30; corrected p=0.002) in the physiological system development and function (Table 3).

Network analysis

For BMDC and MEC experiments, data from three time points were available: before the inoculation, in the very early time points (3 and 1 hours after exposure, respectively) and in the later phase (8 and 5 hours after exposure, respectively). The gene profile in the time course of the infection was analyzed separately in the resistant and susceptible animals. The datasets 1 and 2, and 3 and 4 corresponded to BMDC and MEC respectively, and the datasets 1 and 3, and 2 and 4 to resistant and susceptible animals, respectively. A Pearson correlation matrix was then calculated within the tool Biolayout Express^{3D}, whereby the similarity of the time p-value of each probe was compared between the four datasets. A network graph was drawn with 4020 nodes representing probes connected by 55, 541 edges representing Pearson correlation values above the selected threshold (*r=0.95*). The average connectivity was 252 edges by node. A set of 54 clusters with at least five nodes were found by the MCL algorithm (Figure 1 and Supplemental data 2). The major structure of the graph is relatively balanced between large clusters (>50 nodes, n=19) and cluster of smaller in size (<25 nodes, n=23) (Supplemental data 1).

One way of looking at such a large transcriptional networks (Figure 1) is to focus on the one hand on the clusters whose p-values of the time effect are highly correlated in DC (dataset 1) and MEC (dataset 3) of resistant animals (clusters 7, 8, 10, 12, 13, 31 and 34; Super-cluster A; Supplemental data 3 Figure A) and on the other hand on the clusters whose p-values of the time effect are highly correlated in DC (dataset 2) and MEC (dataset 4) of susceptible animals (clusters 22, 25, 32, 45, 51, 54; Super-cluster B; Supplemental data 3 Figure B). These two groups of clusters were gathered into two super-clusters.

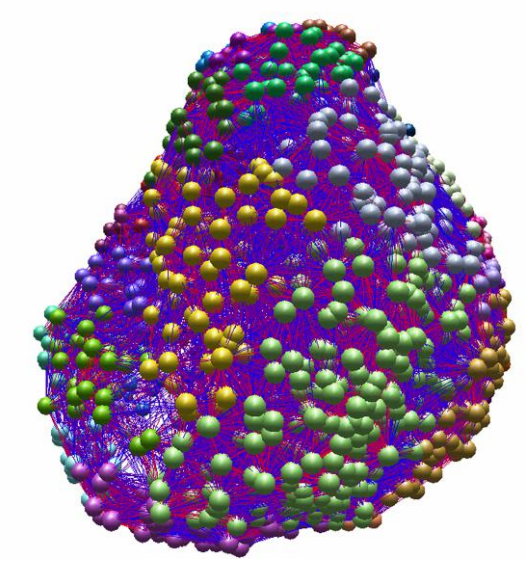


Figure 1: Network of the genes that belong to the DC and MEC experiments (Biolayout, Express[3D])

Biological interpretation of the genes with p-value of the time effect highly correlated in the resistant animals

The genes with time effect p-value highly correlated in the resistant animals in DC and MEC belonged to 7 clusters which are joined in the super-cluster A Annexe). There are 662 genes inside, of which 580 had a HGNC annotation (Supplemental data 2, Super-cluster A). The pathway analysis of this gene list with the database InnateDB revealed the importance of stabilization of P53 (with *psma1, -2, psmd3, -5, -9, -12, psme3* and *tp53;* corrected p=0.020) and P53 pathway (*akt1, cse1l, csnk1d, myst1, rchy1, setd7, tp53;* corrected p=0.040) (Table 4). TNFα played a major role with 19 genes involved in (*akt1, casp3, casp8*…; corrected p=0.025) and also TGFβ receptor (with *eif2a, ppp2r2a, rhoa, smad4, sptbn1, tgfbr1* and *ywhae*; corrected p=0.031) and IFNγ pathway (with *akt1, camk2g, jak1, map2k1, ptpn11* and *rap1a*; corrected p=0.032) (Table 4). The transduction of a signal with the ERK cascade (*map2k1, map2k2, ywhae, ywhah* and *ywhaq*; p=0.022) and AKT(PKB)-Bad signalling (*akt1, ywhae, ywhah* and *ywhaq*; corrected p=0.024) is also well represented (Table 4). The caspases also played a major role with the cleavage of cytoskeletal proteins (*casp3, casp6* and *casp8*; corrected p=0.036) and the caspase 3 activation signaling in Fas and TNFR1 signaling pathways (corrected p=0.0361) (Table 4). The CXCR4-mediated signalling events (*akt1, gnai2, -3, ptpn11, rac1, rhoa, ubqln1* and *vps4b;* corrected p=0.050) was represented in the gene list of the super-cluster A (Table 4).

The function analysis with the IPKB shows that many genes were involved in infectious disease (n=56 genes; corrected p=0.002) and infection mechanism (n=91 genes;

corrected p=0.011), much more in cell death (n=142; corrected p=0.011) and in a lower proportion in the immune cell trafficking (n=17; corrected p=0.010) (Table 4). The cell cycle was well represented (n=76 genes; corrected p=0.011), and also the protein synthesis (n=62; corrected p=0.010) and the post-translational modification (n=64; corrected p=0.011) (Table 4).

Then, the transcription factors that can bind to numerous gene promoter regions were searched with InnateDB. The transcription factor AHR can bind 114 sites (*ie* almost 20% of the genes highly correlated in the resistant animals and with a HGNC annotation which represents 4% of all the AHR binding sites known in InnateDB; corrected p=0.048) (Table 4).

Biological interpretation of the genes with p-value of the time effect highly correlated in the susceptible animals

The genes highly correlated in the susceptible animals belonged to 6 clusters which are joined in the super-cluster B (Annexe). There are five-times less genes in the super-cluster B than in the super-cluster A (n=131, n=121 HGNC) (Supplemental data 2). The pathway analysis of this gene list with InnateDB shows the importance of Fc gamma R-mediated phagocytosis (*dnm1l, marcks, pip5k1a, ppap2a* and *rps6kb1*; corrected p=0.078) (Table 4). The IPKB function analysis shows that the genes are mainly involved in the cellular metabolism: cell cycle (n=26 genes, corrected p=0.038), cellular organization (n=15; corrected p=0.036), but also in hematopoiesis with only 7 genes (corrected p=0.030) (Table 4). No transcription factor could bind significantly any site of the gene list.

Discussion

Three microarray dataset were previously analyzed to investigate immune response to *Staphylococcus* from mastitis resistant and susceptible animals. In the present study, MSC, DC, and MEC datasets were analysed together to improve the power of detection of line-associated genes.

A set of 509 genes were identified as differentially expressed between resistant and susceptible animals, with half the genes up-regulated in resistant animals (n=276). Only two genes *gstm3* (which was represented by two probes) and *tmem87b* were twice-fold more expressed in the susceptible animals than in the resistant ones. The fold-change values of the other genes were very weak (between 0.05 and 1.06). Gene expression varies amongst cell types and the differences between lines may be minimized by analyzing the three cell-based datasets together resulting in low FC values.

Interestingly in network analysis (Biolayout®), a high number of genes (super-cluster A, n=662) were clustered together based on time effect within resistant animals. This means that whatever the exact gene expression evolution in the time course, there are strong relationships between these genes. About the susceptible animals, five times less genes were clustered together (super-cluster B, n=131). This might be interpreted as a lower variability in resistant animals where a common set of genes is determining their behaviour facing an infectious challenge.

Both meta-analysis methods (ANOVA and network analysis) of the microarray datasets led to the confirmation of some information that had been evidenced before during

individual cell analyses and leads to the identification of new response mechanisms that differ between resistant and susceptible animals.

Confirmation of mechanisms previously identified

Firstly, the immune cell trafficking was significant in the ANOVA and in the super-cluster A, with 30 and 17 genes, respectively. Of the genes from the ANOVA, 8 are more expressed in resistant animals whereas 21 genes are more expressed in susceptible ones. Previously, in MSC experiment (4) genes involved in leucocyte adhesion were more expressed in resistant animals whereas in DC and MEC experiments (39) genes that attract neutrophils were up-regulated in susceptible animals. Here, the meta-analyses confirmed that immune cell trafficking is different in resistant and in susceptible animals with the implication of new genes as *il-1a*, *cxcl10, il-10, col1a1, s100b* et *tnf* that are more expressed in susceptible animals. Brand *et al.* (2011) also evidenced the importance of this pathway in dairy cow selected on mastitis resistance (6).

Although no information about pathogen detection was evidenced in the meta-analyses, the MAPK-ERK signalling pathways that follows TLR activation were enhanced in susceptible animals (*atf3, atf4, eif2ak3, hspa5*) and in the super-cluster A (*map2k1, map2k2, ywhae, ywhah, ywhaq*). This pathway is highly involved in oxidative stress and inflammatory process (25) it can lead to cytokine synthesis and determine the Th1 or Th2 response (23). It was already evidenced in MSC experiment (4) with two genes *eif4ebp1* and *itga5* that were more expressed in resistant animals, whereas *mapk8* was up in susceptible animals. So, the meta-analysis enabled the identification of new genes involved in MAPK-ERK signalling and reinforced the observation that inflammatory mechanisms were stronger in the susceptible line.

Interestingly, the gene aryl hydrocarbon receptor (*ahr*) was more expressed in the cells of susceptible animals, as it was already evidenced in MSC (4). The AHR pathway was also highly modified between the divergent lines (ANOVA) with 11 genes involved, among those 8 were more expressed in susceptible animals than in resistant ones. This result is in agreement with findings in BMDC analyses (39). The transcription factor AHR can bind 114 genes that are in super-cluster A, and 33 DEG that were more expressed in MSC of susceptible animals (4), AHR can interact with retinoic acid-signalling pathways (22) and RARA was of major importance in the MSC experiment (4). AHR involvement in the control of inflammatory responsiveness has been reported previously (35). Ligand activation of the AHR can inhibit cell apoptosis (32) and senescence (27), two p53-mediated events. Once *ahr* expression was associated with *tp53* in lung cancer (36). We previously found that *tp53* was more expressed in MSC of resistant animals (4). TP53's signalling pathways were among the most important in super-cluster A.

As a result, the inhibition of AHR and the activation of its antagonist TP53 in resistant animals should be an important key to explain the differences of susceptibility between resistant and susceptible animals.

From the meta-analyses, the third gene with the stronger fold-change between resistant and susceptible animals was *tmem87b* and it was more expressed in susceptible animals (ANOVA). Although, we did not focus on this gene earlier, it was the gene with the highest

fold-change in MSC (4) and DC (39) of susceptible animals, but it was not significant between lines in MEC experiment. *tmem87b* encodes for a trans-membrane protein, but its function has not been yet described. It would be interesting to investigate the role of this protein, to understand it's function and signification in susceptible animals.

New findings

The two approaches for meta-analysis also led to identify other mechanisms that were not significant in the single dataset analyses. For example, the genes *tnf*, *il-1α* and *il-10* were more expressed in the susceptible animals (ANOVA), whereas we did not detect any significant difference between lines in any of the single experiments. In addition, TNF, TNFR1and IL10 anti-inflammatory pathways were mainly up-regulated in susceptible animals and in super-cluster B. TNFα is a pro-inflammatory cytokine, and plays a pivotal role during the acute stage of abscess development through regulating the ensuing anti-bacterial inflammatory response (18). In agreement with the higher abscess occurrence in the susceptible animals than in resistant animals in natural conditions (28). IL1a is a cytokine involved in regulation of inflammation. It can induce TNFα release which agrees with the fact that both IL1 α and TNFα are up-regulated in the susceptible line. Indeed, our results seem to show an enhanced inflammatory process in susceptible animals. By contrast, IL10 is an anti-inflammatory cytokine that has been shown to shut down inflammatory processes (12).

A similar approach to unravel mechanisms of mastitis resistance used dairy cows selected either on SCS or on a QTL associated with mastitis (20). At first, authors measured the expression of several genes by qPCR in MEC from these cows upon stimulation with *E. coli* or *S. aureus* (14), then they used microarrays to evaluate gene expression on a large scale (6). They showed that expression of *tnfα* was more expressed in susceptible cows selected on SCS than in resistant ones after 1h of exposure to *S. aureus,* whereas it was higher in the resistant animals after 6 and 24 hrs of exposure (14). In the microarray analysis they showed that IL1α was increased in resistant cows when compared to susceptible ones during 24h, nevertheless, the expression during the first hour of stimulation increased more strongly in susceptible animals (6), which might be brought together with our results. They found no effect related to IL10 in cows of both genotypes (6). Activation of the IL-10 signalling seems to be a beneficial mechanism adopted by the cells during the last stage of mastitis infection to limit and terminate the inflammatory response (13). On the opposite, early expression of IL-10 may predispose animals to more severe infection due to a partially suppressed and less intense immune response.

Furthermore, although the gene expression of *nfκb* was not modified between the lines, NFκB pathway was enhanced in resistant animals. It was not significant in DEG analysis in the single dataset analysis, but within MSC and MEC networks, nfkb was added to link DEG between resistant and susceptible animals (4, 5).

It is difficult to conclude about inflammatory processes and their regulation since they are either activated or inhibited in both lines. But inflammatory pathways should not be the same in the resistant and susceptible lines.

Interestingly, six and one sub-units of the major histocompatibility complex (MHC) were more expressed in the resistant and susceptible animals, respectively, with four and one of them belonged to the groups of the 10 genes with the highest fold-change (Table 2). All sub-units corresponded to MHC class 1 and three were non-classical. MHC class 1 molecules

display intracellular proteins to cytotoxic T cells. Several dairy cattle studies have reported relationships between bovine MHC class 1 molecules and resistance or susceptibility to mastitis or immune response as reviewed by Rupp et al. (2010). However, there are many polymorphisms identified in MHC region and we are comparing only 12 and 13 animals, so these findings might be used carefully.

Furthermore, antimicrobial peptide SC5 (also named CAMP) was more expressed in resistant animals than in susceptible ones in the meta-analysis whereas it was not significant in the single dataset analyses. SC5 belongs to the cathelicidin anti-microbial family (CAMP) involved in Gram positive and Gram negative bacteria clearance (7). Cathelicidins are only present in infected quarters (34). They should have chemotactic activity for neutrophils (1). Cathelicidin concentration increases with IMI development and it is correlated to SCS at the beginning of the infection (34). Cathelicidins may be used as an early marker of IMI (34). As a result, *sc5* is a relevant functional candidate gene for IMI resistance.

Meta-analyses highlighted gene mechanisms that discriminate resistant and susceptible animals. They enabled us to confirm not only some of our previous findings as the different regulation of cell immune trafficking or inflammatory mechanisms between the lines. The meta-analysis also stressed the involvement of the genes *ahr* and *tp53* that were previously associated with respectively the susceptible and resistant lines. Further analyses are needed to evaluate the role of these genes in predisposition to mastitis.

References

1. **Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, Kiessling R, Jörnvall H, Wigzell H, Gudmundsson GH**. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 96: 3086-3093, 2000.
2. **Benjamini Y, Hochberg Y**. Controlling the false discovery rate - A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* 57: 289-300, 1995.
3. **Bloemhof S, de Jong G, de Haas Y**. Genetic parameters for clinical mastitis in the first three lactations of Dutch Holstein cattle. *Vet. Microbiol* 134: 165-171, 2009.
4. **Bonnefont C, Toufeer M, Caubet C, Foulon E, Tasca C, Aurel MR, Bergonier D, Boullier S, Robert-Granie C, Foucras G, Rupp R**. Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus. *BMC Genomics* 12: 208, 2011.
5. **Bonnefont CMD, Rainard P, Cunha P, Gilbert FB, Toufeer M, Aurel M-R, Rupp R, Foucras G**. Genetic susceptibility to Staphylococcus aureus mastitis in sheep:

transcriptional profiling of mammary epithelial cells in response to living cells or culture supernatant. *Physiological Genomics*. .

6. **Brand B, Hartmann A, Repsilber D, Griesbeck-Zilch B, Wellnitz O, Kuhn C, Ponsuksili S, Meyer HH, Schwerin M**. Comparative expression profiling of E. coli and S. aureus inoculated primary mammary gland cells sampled from cows with different genetic predispositions for somatic cell score. *Genet Sel Evol* 43: 24, 2011.

7. **Brogden KA, Ackermann M, McCray PB Jr, Tack BF**. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int. J. Antimicrob. Agents* 22: 465-478, 2003.

8. **Carlén E, Strandberg E, Roth A**. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score, and production in the first three lactations of Swedish holstein cows. *J. Dairy Sci* 87: 3062-3070, 2004.

9. **Casel P, Moreews F, Lagarrigue S, Klopp C**. sigReannot: an oligo-set re-annotation pipeline based on similarities with the Ensembl transcripts and Unigene clusters. *BMC Proc* 3: S3, 2009.

10. **Detilleux JC**. Genetic factors affecting susceptibility of dairy cows to udder pathogens. *Vet Immunol Immunop* 88: 103-10, 2002.

11. **Emanuelson U, Danell B, Philipsson J**. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell counts, and milk production estimated by multiple-trait restricted maximum likelihood. *J. Dairy Sci* 71: 467-476, 1988.

12. **Fujiwara N, Kobayashi K**. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4: 281-286, 2005.

13. **Genini S, Badaoui B, Sclep G, Bishop SC, Waddington D, Pinard van der Laan M-H, Klopp C, Cabau C, Seyfert H-M, Petzl W, Jensen K, Glass EJ, de Greeff A, Smith HE, Smits MA, Olsaker I, Boman GM, Pisoni G, Moroni P, Castiglioni B, Cremonesi P, Del Corvo M, Foulon E, Foucras G, Rupp R, Giuffra E**. Strengthening insights into host responses to mastitis infection in ruminants by combining heterogeneous microarray data sources. *BMC Genomics* 12: 225, 2011.

14. **Griesbeck-Zilch B, Osman M, Kuhn C, Schwerin M, Bruckmaier RH, Pfaffl MW, Hammerle-Fickinger A, Meyer HHD, Wellnitz O**. Analysis of key molecules of the innate immune system in mammary epithelial cells isolated from marker-assisted and conventionally selected cattle. *J. Dairy Sci.* 92: 4621-4633, 2009.

15. **Heringstad B, Klemetsdal G, Steine T**. Selection responses for disease resistance in two selection experiments with Norwegian red cows. *J Dairy Sci* 90: 2419-26, 2007.

16. **Kehrli ME, Shuster DE**. Factors affecting milk somatic-cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 77: 619-627, 1994.

17. **Khatkar MS, Thomson PC, Tammen I, Raadsma HW**. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genet Sel Evol* 36: 163-190, 2004.

18. **Kielian T, Bearden ED, Baldwin AC, Esen N**. IL-1 and TNF-alpha play a pivotal role in the host immune response in a mouse model of Staphylococcus aureus-induced experimental brain abscess. *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 63: 381-396, 2004.

19. **Koivula M, Mäntysaari EA, Negussie E, Serenius T**. Genetic and phenotypic relationships among milk yield and somatic cell count before and after clinical mastitis. *J. Dairy Sci* 88: 827-833, 2005.

20. **Kuhn C, Reinhardt F, Schwerin M**. Marker assisted selection of heifers improved milk somatic cell countcompared to selection on conventional pedigree breeding values. *Arch. Tierz., Dummerstorf* : 23-32, 2008.

21. **Mrode RA, Swanson GJT**. Genetic and statistical properties of somatic cell count and its suitability as an indirect means of reducing the incidence of mastitis in dairy cattle. *Anim. Breed. Abstr.* 64: 847-857, 1996.

22. **Murphy KA, Quadro L, White LA**. The intersection between the aryl hydrocarbon receptor (AHR)- and retinoic acid-signaling pathways [En ligne]. Dans: *Vitamin A*, p. 33-67. <Go to ISI>://000245587800002.

23. **Nakahara T, Moroi Y, Uchi H, Furue M**. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *J. Dermatol. Sci* 42: 1-11, 2006.

24. **Ogorevc J, Kunej T, Razpet A, Dovc P**. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Anim Genet* 40: 832-51, 2009.

25. **Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW**. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. *Vet. Res.* 34: 597-627, 2003.

26. **Paape MJ, Mehrzad J, Zhao X, Detilleux J, Burvenich C**. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Mammary Gland Biol* 7: 109-21, 2002.

27. **Ray SS, Swanson HI**. Alteration of keratinocyte differentiation and senescence by the tumor promoter dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 192: 131-145, 2003.

28. **Rupp R, Bergonier D, Dion S, Hygonenq MC, Aurel MR, Robert-Granié C, Foucras G**. Response to somatic cell count-based selection for mastitis resistance in a divergent selection experiment sheep. *J. Dairy Sci.* 92: 1203-1219, 2009.

29. **Rupp R, Boichard D**. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Vet. Res.* 34: 671-688, 2003.

30. **Rupp R, Bonnefont C, Bergonier D, Aurel MR, Martin P, Jacquiet P, Moreno C, Robert-Granie C, Rainard P, Foucras G**. An Integrated Genomics Approach Towards Analysis Of Resistance To Mastitis In Ruminants. WCGALP. Leipsig, Germany: 2010.

31. **Rupp R, Lagriffoul G, Astruc JM, Barillet F**. Genetic parameters for milk somatic cell scores and relationships with production traits in French Lacaune dairy sheep. *J. Dairy Sci* 86: 1476-1481, 2003.

32. **Schrenk D, Schmitz H-J, Bohnenberger S, Wagner B, Wörner W**. Tumor promoters as inhibitors of apoptosis in rat hepatocytes. *Toxicology Letters* 149: 43-50, 2004.

33. **Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F**. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res* 34: 475-491, 2003.

34. **Smolenski GA, Wieliczko RJ, Pryor SM, Broadhurst MK, Wheeler TT, Haigh BJ**. The abundance of milk cathelicidin proteins during bovine mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol* 143: 125-130, 2011.

35. **de Souza VR, Cabrera WK, Galvan A, Ribeiro OG, De Franco M, Vorraro F, Starobinas N, Massa S, Dragani TA, Ibañez OM**. Aryl hydrocarbon receptor

polymorphism modulates DMBA-induced inflammation and carcinogenesis in phenotypically selected mice. *Int J Cancer* 124: 1478-1482, 2009.

36. **Su J-M, Lin P, Wang C-K, Chang H**. Overexpression of cytochrome P450 1B1 in advanced non-small cell lung cancer: a potential therapeutic target. *Anticancer Res* 29: 509-515, 2009.

37. **Sugimoto M, Fujikawa A, Womack JE, Sugimoto Y**. Evidence that bovine forebrain embryonic zinc finger-like gene influences immune response associated with mastitis resistance. *P Natl Acad Sci USA* 103: 6454-6459, 2006.

38. **Theocharidis A, van Dongen S, Enright AJ, Freeman TC**. Network visualization and analysis of gene expression data using BioLayout Express(3D). *Nat Protoc* 4: 1535-1550, 2009.

39. **Toufeer M, Bonnefont C, Foulon E, Caubet C, Tasca C, Aurel MR, Robert-Granié C, Rupp R, Foucras G**. Gene expression profiling of BM-derived dendritic cells reveals important mechanisms associated with predisposition to Staphylococcus infections. *PLOS one* 6: e22147, 2011.

40. **Weller JI, Saran A, Zeliger Y**. Genetic and environmental relationships among somatic cell count, bacterial infection, and clinical mastitis. *J. Dairy Sci* 75: 2532-2540, 1992.

Tables

Table 1: Summary of the microarray datasets on mastitis infection included in the meta-analysis

Experiment	Condition	Pathogen	State of pathogen	Time of stimulation	Number of animals	Number of arrays	references
Milk somatic cells (MSC)	*in vivo*	*S. aureus* *S. epidermidis*		12 h	2*6	22	GSE24925 Bonnefont et al., 2011
Dendritic cells (DC)	*in vitro*	*S. aureus*	Pansorbin	0h 3h 8h	2*4	22	GSE24448 Toufeer et al. 2011
Mammary epithelial cells (MEC)	*in vitro*	*S. aureus*	Live strain Supernatant culture	Tref* 1h 5h	2*6	60	GSE30390 Bonnefont et al. 2011 submitted

* Tref for MEC experiment corresponded to a 1h-culture without stimulation

Table 2: List of the ten genes up and down regulated

ProbeName	TargetID	Genes	Log ratio	StdErr	corrected p-val
A_70_P016556	DQ223552	GSTM3	-1.0603	0.1464	<0.0001
A_70_P016557	DQ223552	GSTM3	-1.0448	0.1506	<0.0001
A_70_P057056	EE780570	TMEM87B	-1.0183	0.07913	<0.0001
A_70_P006531	EE781152	CPB2	-0.8232	0.1402	0.0001
A_70_P053411	TC33239	PLAT	-0.7499	0.1508	0.0002
A_70_P045136	TC44395	MHC-NC1	-0.7269	0.1242	0.0001
A_70_P006201	FE031048	MAPRE1	-0.6836	0.1235	0.0001
A_70_P005636	EE784504	TFPI2	-0.6262	0.1787	0.0011
A_70_P039056		-	-0.5935	0.124	0.0003
A_70_P065771	EE758227	CYP1B1	-0.5796	0.105	0.0001
A_70_P016811	M34672	MHC1	0.5532	0.1309	0.0005
A_70_P051151	NM_001009758	PEPT1	0.5537	0.09319	0.0001
A_70_P006016	EE850070	CAT	0.5658	0.1114	0.0002
A_70_P001856	GW997506	RPL39	0.5702	0.117	0.0002
A_70_P006416	EE782850	MMP12	0.5716	0.1556	0.0009
A_70_P051152	NM_001009758	PEPT1	0.6116	0.08586	<0.0001
A_70_P030426	NM_001009406	SC5	0.6547	0.06467	<0.0001
A_70_P001626	CN824748	MHC-NC1	0.7285	0.1336	0.0001
A_70_P046321	EE861788	MHC- NC1	0.7595	0.1435	0.0001
A_70_P056847	M34674	MHC1	0.9737	0.1773	0.0001

Table 3: Table with the main pathways and functions in ANOVA Res Susc

ANOVA InnateDB	Genes Ratio	p-value	Corrected p-value	Gene Symbols
Collagen adhesion via Gp IV	100%	<0.0001	0.010	CD36 ; COL1A1 ; COL1A2 ;
Collagen adhesion via alpha 2 beta 1 glycoprotein	50%	0.0043	0.178	COL1A1 ; COL1A2 ;
Caspase3 activation signaling (Fas signaling pathway)	67%	0.0022	0.121	CASP3 ; CASP8 ;
Caspase3 activation signaling (TNFR1 signaling pathway)	67%	0.0022	0.121	CASP3 ; CASP8 ;
Caspase cascade in apoptosis	13%	0.0240	0.289	BIRC3 ; CASP3 ; CASP8 ;
Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal proteins	22%	0.0237	0.293	CASP3 ; CASP8 ;
PERK regulated gene expression	36%	0.0002	0.038	ATF3 ; ATF4 ; EIF2AK3 ; HSPA5 ;
Il-10 anti-inflammatory signaling pathway	23%	0.0047	0.180	HMOX1 ; IL10 ; IL1A ;
Tnfr1 signaling pathway	18%	0.0104	0.223	BIRC3 ; CASP3 ; CASP8 ;
TNF receptor signaling pathway	9%	0.0341	0.290	BIRC3 ; CASP8 ; MAP4K2 ; SQSTM1

ANOVA BIOCARTA	%	p-value	Fold Enrichment	FDR	Genes
IL-10 Anti-inflammatory Signaling Pathway	99%	0.0023	13.59	2.50	TNF, HMOX1, IL10, IL1A
SODD/TNFR1 Signaling Pathway	74%	0.0313	10.19	30.00	TNF, CASP8, BIRC3

ANOVA IPA Cannonical pathways	Ratio	p-value	Molecules
Endoplasmic Reticulum Stress Pathway	22.20%	0.0005	CASP3, ATF4, HSPA5, EIF2AK3
TNFR1 Signaling	11.30%	0.0005	MAP4K2, PAK1, CASP3, CASP8, BIRC3, TNF
TWEAK Signaling	7.69%	0.0339	CASP3, CASP8, BIRC3
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	6.92%	0.0001	TP53, MYC, GSTM1, IL1A, CYP1A1, GSTM3, ALDH18A1, TNF, NFE2L2, AHR, CYP1B1
LXR/RXR Activation	6.45%	0.0052	IL1A, CD36, PTGS2, TNF, MMP9, ABCA1
ERK/MAPK Signaling	5.39%	0.0018	PRKACB, MYC, FYN, PAK1, ATF1, PPP2R4, VRK2, PRKAG2, ATF4, ELK3, EIF4EBP1
IL-1 Signaling	4.67%	0.0447	PRKACB, IL1A, PRKAG2, ADCY7, GNG5

ANOVA IPA function	p-value	Count
Cell Death	4,06E-08-2,19E-03	101
Cellular Movement	7,03E-06-1,78E-03	63
Hematopoiesis	7,03E-06-2,15E-04	16
Immune Cell Trafficking	7,03E-06-1,78E-03	30
Inflammatory Response	7,03E-06-1,78E-03	58
Inflammatory Disease	1,14E-05-2,19E-03	103

Resistant BBID	%	p-value	Fold Enrichment	FDR	Genes
NF-kB_activation	1.33	0.0285	9.03	0.17	TP53, MYC, TRAF5

Susceptible BBID	%	p-value	Fold Enrichment	FDR	Genes
Macrophage_regulation_of_CD4+T_cells	1.68	0.0228	10.74	0.19	TNF, IL10, IL1A
Alternatively_Activated_APC	1.68	0.0275	9.76	22.41	TNF, IL10, IL1A

Susceptible BIOCARTA	%	p-value	Fold Enrichment	FDR	Genes
IL-10 Anti-inflammatory Signaling Pathway	2.23	0.0003	25.55	0.33	TNF, HMOX1, IL10, IL1A
SODD/TNFR1 Signaling Pathway	1.68	0.0090	19.16	0.88	TNF, CASP8, BIRC3

Table 4: Table with the main pathways and functions in genes well correlated in resistant and susceptible animals

Super-clusterA - InnateDB	Ratio	Corrected p-value	Gene Symbols
P53 pathway	12%	0.0398	AKT1,CSE1L,CSNK1D,MYST1,RCHY1, SETD7,TP53,
Stabilization of p53	17%	0.0201	PSMA1,PSMA2,PSMD12,PSMD3,PSMD5, PSMD9,PSME3,TP53,
ERK cascade	33%	0.0220	MAP2K1,MAP2K2,YWHAE,YWHAH,YWHAQ,
AKT(PKB)-Bad signaling	36%	0.0244	AKT1,YWHAE,YWHAH,YWHAQ,
TNFalpha	10%	0.0247	AKT1,CASP3,CASP8,COPS3,CSNK2A1, FLNA,HSP90AA1,NKIRAS2,POLR1D, POLR1E,PSMD12,PSMD3,PTPN11, SMARCC1,TRADD,UBE2D2,YWHAE, YWHAH,YWHAQ,
TGF beta receptor I degradation signaling	17%	0.0207	PSMA1,PSMA2,PSMD12,PSMD3,PSMD5, PSMD9,TGFBR1,
TGF beta receptor complex degradation signaling	15%	0.0266	PSMA1,PSMA2,PSMD12,PSMD3,PSMD5, PSMD9,TGFBR1,
TGF-beta receptor signaling	14%	0.0307	EIF2A,PPP2R2A,RHOA,SMAD4, SPTBN1,TGFBR1,YWHAE,
IFN-gamma pathway	15%	0.0318	AKT1,CAMK2G,JAK1,MAP2K1, PTPN11,RAP1A,
Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal proteins	33%	0.0357	CASP3,CASP6,CASP8,
Caspase3 activation signaling (Fas signaling pathway)	67%	0.0361	CASP3,CASP8,
Caspase3 activation signaling (TNFR1 signaling pathway)	67%	0.0361	CASP3,CASP8,
CXCR4-mediated signaling events	11%	0.0497	AKT1,GNAI2,GNAI3,PTPN11,RAC1,RHOA, UBQLN1,VPS4B,

Super-cluster B - InnateDB - KEGG	Ratio	p-value	Corrected p	Gene Symbols
Fc gamma R-mediated phagocytosis	5%	0.0006	0.0781	DNM1L,MARCKS,PIP5K1A,PPAP2A,RPS6KB1

Super-cluster B - IPA functions	p-value	Count
Cell Cycle	3,92E-06-3,8E-02	26
Cellular Assembly and Organization	3,52E-05-3,58E-02	15
Cell Death	1,66E-04-3,71E-02	32
Hematopoiesis	8,72E-04-2,95E-02	7

TF Name	Count	Gene Ratio	p-value	Corrected p-value
AHR	114	4%	0.0013	0.046

Super-cluster A - IPA functions	p-value	Count
Cell Death	2,18E-07-1,16E-02	142
Post-Translational Modification	1,29E-06-1,16E-02	64
Cell Cycle	1,4E-06-1,16E-02	142
Protein Synthesis	2,52E-06-9,8E-03	62
Infectious Disease	3,85E-06-2,01E-03	56
Infection Mechanism	1,84E-05-1,17E-02	91
Immune Cell Trafficking	3,48E-04-1,02E-02	17

Supplemental data

Supplemental data 1: List of the 509 differentially expressed genes between resistant and susceptible animals with milk somatic cell, dendritic cell and mammary epithelial cell datasets

Supplemental data 2: List of the genes that belong to DC and MEC experiments and their repartition in clusters with the MCL algorithm of Biolayout Express3D and in super-cluster

Supplemental data 3: Figure A : Clusters 7, 8, 10, 12, 13, 31 and 34 with genes highly correlated in DC (dataset 1) and MEC (dataset 3) of resistant animals (Supercluster A). The graphs show the correlation of the p-value of the time effect in the 4 datasets. Figure B: Clusters 22, 25, 32, 45, 51, 54 with genes highly correlated in DC (dataset 2) and MEC (dataset 4) of susceptible animals (Supercluster B). The graphs show the correlation of the p-value of the time effect in the 4 datasets.

4 Discussion

Dans cet article, nous avons comparé les **profils géniques exprimés par les cellules dendritiques, les cellules du lait et les cellules épithéliales mammaires** afin d'identifier des gènes dont le profil d'expression serait communément régulé en réponse à la stimulation par un staphylocoque dans l'objectif d'accroître la connaissance des mécanismes cellulaires de réponse aux infections chez les brebis de la lignée résistante et chez les brebis de la lignée sensible.

L'analyse de variance a permis d'identifier 509 gènes différemment exprimés entre les deux lignées dont la moitié était plus exprimée chez les brebis de la lignée résistante (n=276), et seulement deux gènes *gstm3* et *tmem87b* avait un fold-change supérieur à 2. Les faibles fold-changes observés pour les autres gènes sont liés au fait que les échantillons proviennent de type cellulaire différent, pour lesquels les niveaux d'expression varient.

L'analyse des réseaux de gènes avec (Biolayout®) a permis de regrouper un grand nombre de gènes (Super-cluster A, n=662) dont la p-value de l'effet *Temps* est fortement corrélée dans les CEM et les CD des brebis de la lignée résistante. Cinq fois moins de gènes (Super-cluster B, n=131) sont regroupés autour des CD et CEM des brebis de la lignée sensible, ce qui suggère une variabilité plus faible des brebis de la lignée résistante en réponse à une infection.

Dans ces méta-analyses, certains résultats identifiés auparavant ont été retrouvés, et de nouveaux résultats ont été mis en évidence, et nous ont permis de formuler de nouvelles hypothèses.

Confirmation de mécanismes déjà identifiés

Tout d'abord, des gènes inclus dans la migration des cellules immunitaires ont été identifiés dans l'ANOVA (n=30) et le super-cluster A (n=17). Parmi les gènes différemment exprimés dans l'ANOVA, 8 sont plus exprimés chez les brebis de la lignée résistante. Auparavant dans l'analyse des CSL, des gènes impliqués dans l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales étaient plus exprimés chez les brebis de la lignée résistante alors que dans les CD et les CEM les gènes qui attirent les neutrophiles sont plus exprimés chez les brebis de la lignée sensible. La méta-analyse confirme que la migration des cellules immunitaires est différente dans les deux lignées avec l'implication de nouveaux gènes *il-1α, cxcl10, il-10, col1a1, s100b, tnf* qui sont plus exprimés chez les brebis de la lignée résistante. Brand *et al.* (2011) avait aussi mis en évidence cette voie lors de la comparaison de vaches sélectionnées sur QTL.

Bien qu'auncune information sur la détection des agents pathogènes ne soit mise en évidence dans la méta-analyse, la voie de signalisation des MAPK-ERK qui suit l'activation des TLR est favorisée chez les brebis de la lignée sensible (*atf3, atf4, eif2ak3*, *hspa5*) et dans le super-cluster A (*map2k1, map2k2, ywhae, ywhah, ywhaq*). Cette voie de signlaisation conduit à des processus inflammatoires et du stress oxydatif (Paape et al. 2003). Elle peut conduire à la synthèse de différentes cytokines qui déterminent les réponses Th1 ou Th2 (Nakahara et al. 2006). Cette voie métabolique avait déjà été identifiée dans les analyses des CSL avec les gènes *eif4ebp1* et *itga5* plus exprimés dans les CSL des brebis de la lignée résistante alors que le gène *mapk8* était plus exprimé chez les brebis de la lignée sensible. Ainsi, la méta-analyse a permis d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la voie de signalisation de MAPK-ERK et renforce le fait que les mécanismes inflammatoires sont plus poussés chez les brebis de la lignée sensible.

Il est intéressant de constater que le gène aryl hydrocarbon receptor (*ahr*) est plus exprimé chez les brebis de la lignée sensible, ce qui confirme les résultats des CSL. La voie métabolique de AHR est aussi modifiée dans l'ANOVA avec 8 gènes plus exprimés chez les brebis de la lignée sensible, ce qui s'accorde aux analyses des CD. De plus le facteur de transcription AHR peut se lier à 114 gènes du super-cluster A et à 33 gènes plus exprimés dans les CSL des brebis de la lignée sensible. Il a été montré que AHR peut interagir avec la voie métabolique de l'acide rétinoïque (Murphy et al. 2007) et RARA avait été clairement identifié dans les analyses des CSL. AHR joue un rôle dans le contrôle de la réponse inflammatoire (de Souza et al. 2009). Dans une étude sur le cancer l'expression d'*ahr* a été associée à celle de *tp53* (Su et al. 2009). Nous avions déjà trouvé *tp53* comme plus exprimé dans les CSL des brebis de la lignée résistante. Dans l'étude du super-cluster, la voie de signalisation de *TP53* est fortement représentée.

En résumé, l'inhibition de AHR et l'activation de son antagoniste TP53 chez les brebis de la lignée résistante pourraient être des clés importantes pour expliquer les différences de sensibilité entre les animaux des deux lignées.

Dans la méta-analyse, *tmem87b* est l'un des gènes avec les fold-changes les plus élevés chez les brebis de la lignée sensible. Bienque nous n'ayons pas porté attention à ce gène, il était le gène le plus fortement exprimé chez les brebis de la lignée sensible dans les analyses des CSL et des CD, mais il n'était pas significatif dans l'étude des CEM. Le gène *tmem87b* code pour une protéine trans-membranaire dont la fonction n'est pas connue. Il serait intéressant d'investiguer le rôle de cette protéine pour comprendre sa fonction et sa signification chez les brebis de la lignée sensible.

Nouveaux résultats

La méta-analyse a aussi permis d'identifier d'autres mécanismes qui ne sont pas significatifs dans les analyses monocellulaires. Par exemple, les gènes *tnf, il-1α* et *il-10* sont plus exprimés chez les brebis de la lignée sensible (ANOVA), alors qu'aucune information n'était disponible auparavant. De plus les voies métaboliques de TNF, TNFR1 et IL10 sont plus activées chez les brebis de la lignée sensible et dans le super-cluster B. TNFα est une cytokine pro-inflammatoire et joue un rôle déterminant dans le développement des abcès en contrôlant la réponse inflammatoire antimicrobienne (Kielian et al. 2004). Cela correspond à la fréquence plus élevée d'abcès mammaires chez les brebis de la lignée sensible (Rupp et al. 2009). IL-1α est une cytokine impliquée dans la régulation de l'inflammation. Elle peut induire la sécrétion de TNFα. Ces résultats semblent montrer des processus inflammatoires supérieurs chez les brebis de la lignée sensible. Mais IL10 est une protéine anti-inflammatoire qui peut changer la direction de l'inflammation (Fujiwara et Kobayashi 2005).

Dans l'étude de vaches sélectionnées sur la résistance aux mammites, *tnfα* est plus exprimé chez les vaches sensibles après 1h de stimulation, puis chez les vaches résistantes après 6 et 24h d'exposition (Griesbeck-Zilch et al. 2009). Dans l'analyse microarray, l'expression d'*il-1α* augmente au cours du temps chez les vaches résistantes ; mais après 1h de stimulation *il-1α* a été plus induit chez les vaches sensibles (Brand et al. 2011), ce qui est peut-être en adéquation avec nos résultats. Mais ils n'ont observé aucun effet sur l'*il-10.*

Il est difficile de donner une conclusion claire sur les processus inflammatoires et leur régulation. Mais il est probable que les processus inflammatoire ne passent pas par les mêmes voies de signalisation chez les brebis de la lignée résistante et chez celles de la lignée sensible.

On peut signaler que cinq transcrits du CMH de classe 1 (classique et non classique) sont parmi les gènes les fold-change les plus élevés, dont quatre sont plus exprimés chez les brebis de la lignée résistante. Toutefois ces résultats sont à nuancer par le fait que le CMH est une zone chromosomique très polymorphe et que ces résultats ne sont peut-être pas pertinents d'un point de vue biologique.

Cependant, le gène codant pour le peptide antimicrobien (SC5), une cathélicidine de la famille des CAMP, appartient à la liste des 10 gènes les plus exprimés chez les brebis de la lignée résistante (ANOVA). Les cathélicidines sont des molécules du système immunitaire inné qui agissent dans l'élimination des bactéries Gram positive ou Gram négative (Brogden et al. 2003). Il semblerait qu'elles aient aussi une activité chimio-attractante pour les neutrophiles (Agerberth et al. 2000). Leur concentration augmente parallèlement au développement de l'IMI (Smolenski et al. 2011). Ainsi *sc5* est un gène candidat fonctionnel pertinent pour expliquer les différences de sensibilité aux IMI dans les deux lignées.

En résumé, la méta-analyse a souligné des mécanismes immunitaires qui permettent de distinguer les brebis de la lignée résistante de celles de la lignée sensible. Elle nous a permis de retrouver et donc de conforter des résultats précédents entre les lignées comme la migration des cellules immunitaires et les mécanismes inflammatoires. Elle a aussi permis de mettre l'accent sur des gènes comme *ahr* et *tp53* qui avaient déjà été associés aux lignées et de découvrir un autre gène (*sc5*) qui semble de première importance entre les lignées. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour évaluer le rôle de ces gènes dans la prédisposition aux mammites.

PARTIE 5 : ETUDE DU POLYMORPHISME DE L'ADN DANS LES POPULATIONS DE BREBIS CCS+ ET CCS-

1 Contexte et objectifs

Pour compléter l'étude des lignées divergentes et essayer de comprendre sur quels gènes la sélection sur les SCS agit, nous avons étudié le polymorphisme de l'ADN sur cette ressource animale. Nous avons sélectionné un sous-ensemble d'animaux qui étaient génotypés et pour lesquels nous disposions d'un phénotypage fin. Dans un premier temps, nous avons comparé les brebis des deux lignées par des études d'association, puis nous nous sommes concentrés sur un phénotype particulier qui est la présence d'abcès.

Les abcès sont des amas purulents situés dans une cavité du parenchyme qui se forme en réponse à un processus infectieux (Marogna et al. 2010). Ils sont principalement provoqués par *S. aureus* (Marogna et al. 2010). Comme ils renferment des bactéries, ils représentent des foyers d'infection chronique. La détection des abcès est effectuée lors d'examen clinique du tissu mammaire. Dans les lignées divergentes, la fréquence d'apparition des abcès était supérieure chez les brebis de la lignée sensible que chez celles de la lignée résistante en infection naturelle (Rupp et al. 2009) et en infection expérimentale (Bonnefont et al. 2011). De plus la distribution des abcès indiquant des répartitions inégales au sein des familles (données non publiées) laisse envisager un déterminisme oligogénique pour la formation des abcès. Sous cette hypothèse, le dispositif des lignées divergentes (entre 20 et 40 cas selon les définitions retenues) doit être suffisant pour détecter des zones chromosomiques associées à la formation des abcès.

Après avoir décrit brièvement les matériels et les méthodes utilisés pour ces études d'association, je vais présenter l'étude des lignées divergentes, suivie de celle des abcès du tissu mammaire. Puis les résultats obtenus sont discutés et confrontés aux résultats des analyses transcriptomiques.

2 Matériel et méthode

2.1 Phénotypage fin des lignées CCS

Le phénotypage fin des brebis a été réalisé par examen clinique des mamelles par le personnel de l'unité de La Fage (UE321) en charge du troupeau expérimental. La détection des abcès n'est pas aisée car des kystes peuvent avoir des aspects similaires aux abcès, c'est pourquoi la formation des observateurs est déterminante pour la qualité des résultats. Le nombre, la localisation ainsi que la taille des abcès superficiels ont été enregistrés. Les examens cliniques ont été réalisés sur 638 brebis dont 334 ont été génotypées. Parmi lesquelles, il y a 152 brebis de la lignée sensible (CCS+) et 182 brebis de la lignée résistante (CCS-) (Tableau 8). Chaque brebis a été examinée trois fois par lactation en moyenne. Les observations se sont déroulées sur les trois premières lactations (L1, L2 et L3). Toutes les femelles ont été examinées au cours de la première lactation (L1), 47% en L2 et 32% en L3. Les pourcentages d'observation plus faibles en lactation 2 et 3 sont dus au millésime des brebis et aux réformes successives. A cause du moindre nombre d'observations pour les deuxième et troisième lactations, nous avons étudié l'association du polymorphisme de l'ADN uniquement avec les données de la première lactation. Seule l'information sur le

nombre d'abcès à chaque observation a été utilisée, sans prendre en compte l'information sur la taille et la localisation. Ainsi l'étude de la présence d'abcès nous a permis d'ajouter un caractère supplémentaire de détermination de la résistance des brebis aux IMI et d'étudier le polymorphisme de l'ADN.

Dans une première étude (**Analyse 1**), le caractère analysé est l'appartenance aux lignées divergentes (CCS+ *vs* CCS-), considéré comme binaire (Tableau 8).

Dans l'**Analyse 2**, les abcès sont considérés comme présents ou absents. Il s'agit donc d'un dispositif cas / contrôle **(binaire).** Les cas correspondent aux brebis pour lesquelles au moins un abcès a été détecté à au moins deux reprises. Les contrôles sont des brebis qui ont été examinées au moins trois fois et pour lesquelles aucun abcès n'a été détecté (Analyse 2, Tableau 8). L'objectif est de différencier les brebis avec une présence chronique d'abcès des brebis saines.

Dans l'**Analyse 3**, les abcès sont classés par catégorie en considérant les brebis qui ont eu au moins trois examens cliniques (pour que le paramètre soit fiable) (Analyse 3, Tableau 8). La variable descriptive ***abces*** est présentée ci-dessous :

***abces* = 0** si jamais d'abcès au cours de la lactation L1
***abces* = 1** si un abcès détecté au cours de la lactation L1
***abces* = 2** si deux abcès détectés au cours la lactation L1
***abces* = 3** si trois abcès détectés au cours de la lactation L1
***abces* = 4** si quatre ou cinq abcès détectés au cours de la lactation L1
***abces* = 5** si plus de 5 abcès ont été détectés au cours de la lactation L1.

Tableau 8 : Effectifs des brebis dans chaque analyse

Analyse 1 : Lignée

Lignée	CCS-	CCS+
Effectif	152	182

Analyse 2 : Abcès binaire

abces	contrôles	cas
Effectif	117	20

Analyse 3 : Abcès par catégorie

abces	0	1	2	3	4	5
Effectif	117	9	10	7	5	10

2.2 Les données de génotypage

Les génotypages des 334 brebis ont été effectués sur la puce SNP ovine 54K (BeadChip Illumina®, cf 2.2.1) sur la plateforme Labogena entre 2010 et 2011.

En parallèle de l'analyse des brebis du protocole CCS (n=334 brebis), 1024 béliers d'insémination animale (IA) de la race Lacaune ont été génotypés avec la même puce SNP pour rechercher des QTL sur des phénotypes de production (quantité de lait, taux butyreux, taux protéique…) et de résistance aux mammites en utilisant les SCS. Les génotypes des animaux des deux protocoles (lignées CCS et béliers d'IA) ont été rassemblés (n=1358) et les protocoles de préparation des données SNP présentés ci-dessous ont été appliqués sur ce double-jeu de données.

Les 54 241 SNP de la puce ovine doivent être filtrés pour ne garder que des marqueurs informatifs, comme il a été proposé pour la puce bovine (Wiggans et al. 2009).

Vérification des parentés

Tout d'abord les incohérences de filiation sont éliminées. Ces incohérences peuvent être expliquées par trois scénarii : i) la présence d'une mutation sur ce SNP au cours de la génération, ii) un problème de génotypage de ce marqueur chez le père ou le fils, iii) une erreur de filiation. La fréquence des mutations dans une zone précise du génome étant très faible, si le pourcentage d'incohérence entre les marqueurs du père et de son fils (rapport entre le nombre de marqueurs incohérents et le nombre de marqueurs totaux) est trop grand, il est fort probable qu'il y ait une erreur de filiation. L'animal est alors éliminé ou son père biologique est recherché dans les données disponibles.

Fréquence minimale d'un allèle

On considère que si la fréquence d'un allèle est très faible, on ne sait pas faire la distinction entre une erreur de génotypage et un allèle très rare. Au laboratoire, nous avons harmonisé les protocoles de préparation des données SNP et les SNP dont la fréquence minimale d'un allèle (*Minimum Allele Frequency*, MAF) est inférieure à 1% ont été éliminés.

Equilibre de Hardy-Weinberg

Selon la théorie de l'équilibre de Hardy-Weinberg (1908), la fréquence des allèles et celle du génotype d'un locus restent constantes, si la population est de taille infinie, et qu'il n'y a ni sélection, ni migration, ni mutation. Ainsi, si on note p la fréquence de l'allèle A_1 et q celle de l'allèle A_2 (p + q =1), les fréquences génotypiques doivent être :

$$f_{A_1A_1} = p^2, f_{A_1A2} = pq \, et \, f_{A_2A_2} = q^2$$

Des tests permettent de vérifier si chaque SNP suit cette théorie. Les SNP qui ne suivent pas cette loi sont éliminés, car on considère que leur information est fausse probablement en raison d'erreur de génotypage.

Validité des génotypes

La précision technique du génotypage à chaque SNP est évaluée par un paramètre appelé le ***call rate***. Plus le ***call rate*** est grand, plus le risque d'attribuer un mauvais génotype à un individu est faible. Les SNP dont le ***call rate*** était inférieur à 0,97 ont été éliminés pour limiter les erreurs.

SNP polymorphes

Les SNP monomorphes dans la population totale génotypée des brebis Lacaune (*ie* les SNP qui n'ont qu'un seul allèle dans toute la population étudiée) ont été éliminés car ils n'apportent aucune information sur la population étudiée, et ils augmentent inutilement le nombre de tests.

SNP conservés pour l'analyse

Ainsi, après l'application des filtres précédents, 43 445 SNP ont été conservés sur les 54 241 disponibles. La répartition des SNP sur chaque chromosome ainsi que l'espacement moyen entre deux SNP sont représentés sur la Figure 14 et Annexe 2. Les trois premiers chromosomes sont au moins deux fois plus long que les autres chromosomes et ils portent un tiers des SNP totaux (11,2 % pour OAR1, 10,8 % pour OAR2 et 9,6 % pour OAR3). L'espacement moyen entre deux SNP conservés est de 62 868 paires de bases. Il varie entre 56 031 paires de bases pour OAR2 et 77590 pour OAR21. Le nombre de marqueurs et leur densité sont élevés sur les trois premiers chromosomes, la densité sur les chromosomes OAR4 à OAR9 reste élevée, mais l'espacement moyen entre deux SNP varie beaucoup sur les chromosomes suivants.

En résumé, l'application des filtres a permis de réduire le nombre de SNP de 80%. Cet ensemble de SNP est conservé pour les deux protocoles, lignée CCS et béliers reproducteurs. Parmi les SNP sélectionnés pour les analyses, quinze sont monomorphes pour l'ensemble des 334 brebis génotypées dont 5 sur OAR1 et 0, 1 ou 2 SNP sur les autres OAR.

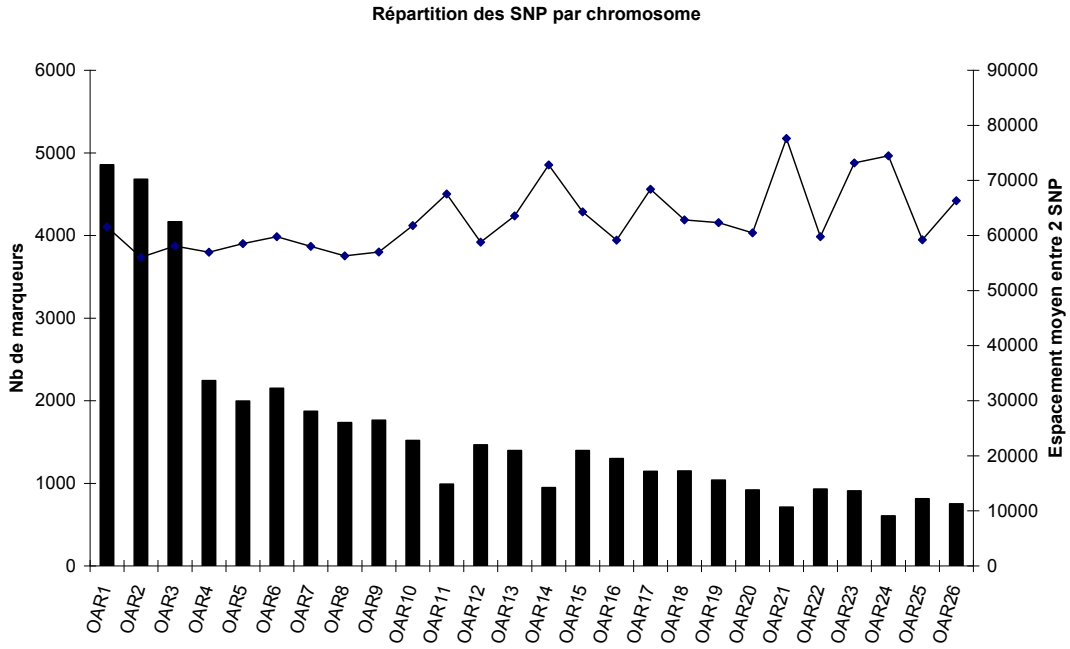


Figure 14 : Nombre de SNP (en barre verticale) et espacement moyen entre deux SNP (ligne) par chromosome

2.3 Méthode : Modèle de régression polygénique

Le principe des méthodes d'analyse du polymorphisme de l'ADN repose sur un test qui compare les fréquences des génotypes chez les cas et les contrôles pour chaque SNP.

Chacune des lignées de brebis est issue de 32 pères fondateurs pour des effectifs de 152 brebis de la lignée sensible et 182 brebis de la lignée résistante, ce qui signifie qu'au sein de lignées, il existe des structures familiales qu'il est important de prendre en compte dans le modèle pour diminuer le nombre de faux positif.

Le modèle de régression polygénique permet de prendre en compte cette relation de parenté dans le pedigree des animaux. Dans notre cas, les informations des quatre générations précédentes ont été considérées.

Le modèle linéaire mixte suivant a été utilisé :

$$Y = X\beta + Zu + e$$

où Y est le phénotype observé (variable abcès binaire, catégorielle ou lignée)
X est la matrice d'incidence liant les génotypes à chaque animal,
β l'effet génotypique,
Z la matrice d'incidence des effets polygéniques liant chaque animal à son phénotype et u, les effets polygéniques aléatoires avec $u \approx \mathrm{N}\left(0, A\sigma_a^2\right)$, avec A la matrice de parenté et σ_a^2 la variance génétique.

L'avantage de cette méthode provient du fait que les effets polygéniques sont estimés conjointement à l'effet du SNP (et de son erreur d'estimation).

La méthode du maximum de vraisemblance restreint (*Residual Maximum Lilehood, REML*) a été appliquée à ce modele à l'aide du logiciel ASReml (Gilmour et al. 2006). Nous avons ainsi obtenu l'effet de chaque SNP et les composantes de la variance, ce qui permet de calculer l'héritabilité :

$$h^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_p^2},$$

où σ_a^2 est la variance génétique additive,
et σ_p^2 est la variance phénotypique.

Le modèle de régression polygénique est appliqué indépendamment à chacun des 43445 SNP. La pvalue ($-\log_{10}$(p-value)) de l'effet de chaque SNP est calculée à l'aide d'un test T. Il est important de corriger le seuil de significativité pour les tests multiples. Généralement, une correction de Bonferroni à 5% est appliquée préférentiellement à l'échelle du génome et parfois à l'échelle du chromosome ($= -\log\left(0{,}05 \middle/ nb\,snp\right)$).

En pratique, nous avons adapté des programmes écrits en R, disponibles au laboratoire, dans lequels était implémentée la méthode ASREML.

3 Résultats

3.1 Etude des lignées sensible et résistante

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la comparaison des lignées divergentes (Analyse 1). Parmi les 334 brebis, les 182 brebis de la lignée résistante (CCS-) sont issues de 32 pères et les 152 brebis de la lignée sensible de 32 pères aussi.

Le modèle de régression polygénique a permis d'identifier un seul SNP, situé sur le chromosome OAR 8, significatif au seuil de Bonferroni de 5% au niveau du génome (Figure 15, Tableau 10).

Trois SNP supplémentaires sont significatifs au seuil de Bonferroni de 5% au niveau des chromosomes, ils sont situés sur OAR7, OAR8 et OAR10 (Tableau 9).

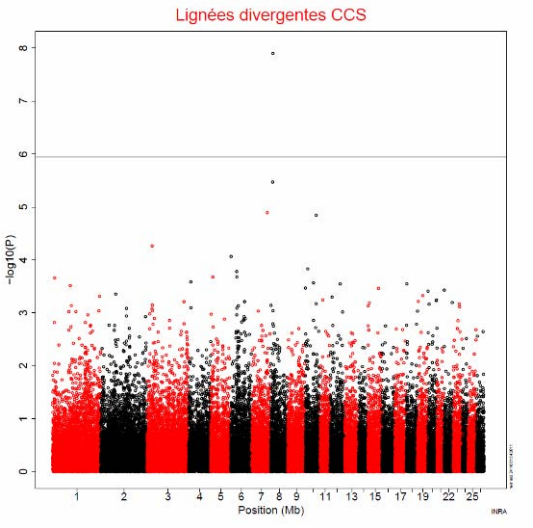


Figure 15 : Significativité de tous les SNP dans l'analyse des lignées divergentes de brebis. La ligne horizontale représente le seuil de Bonferroni à 5% au niveau du génome.

Tableau 9 : Description des SNP significatifs dans l'analyse des lignées divergentes de brebis.

OAR	Nom SNP	SNP	Position (b)	statistique	p-val	-log10(p)
7	s31378.1	1533	82100777	82.1	1.28E-05	4.89
8	OAR8_12151702.1	201	10944099	10.9	3.38E-06	5.47
8	OAR8_13942037.1	229	12529389	12.5	1.25E-08	7.9
10	OAR10_64437802.1	1088	60753279	60.8	1.43E-05	4.84

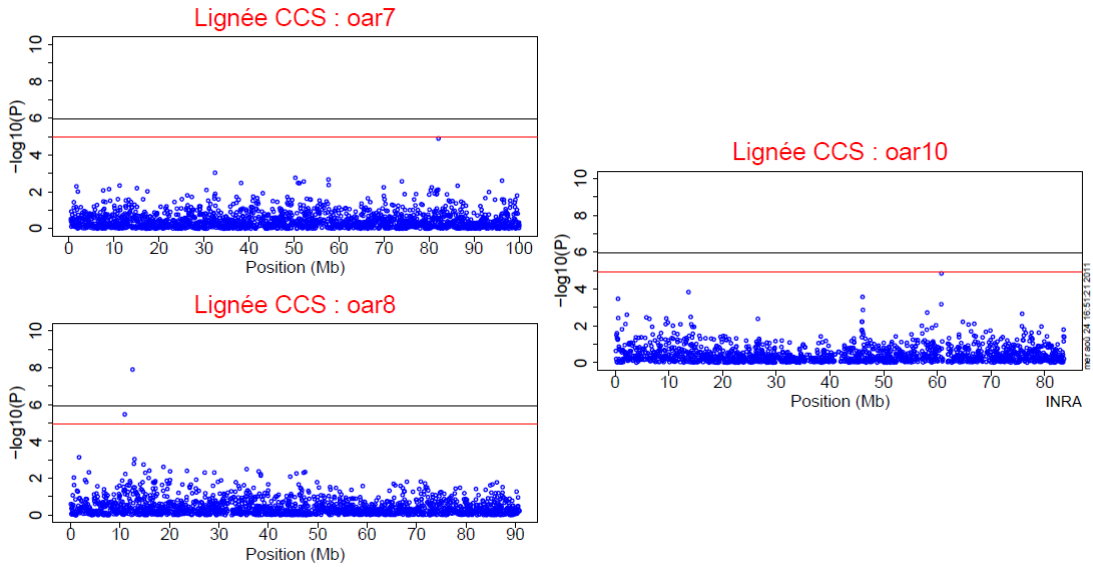


Figure 16 : Significativité des SNP dans l'analyse des lignées divergentes de brebis sur les chromosomes OAR7, OAR8 et OAR10 qui contiennent au moins un SNP significatif. Les lignes noire et rouge représentent les seuils de significativité avec la correction de Bonferroni à 5% au niveau du génome et de chaque chromosome, respectivement.

3.2 Etude du caractère « Abcès mammaires »

3.2.1 Analyse binaire

Dans un premier temps, j'ai analysé le phénotype présence / absence d'abcès comme défini précédemment dans l'analyse 2. Parmi les 20 cas disponibles, 18 sont issus de la lignée CCS+ et 2 de la lignée CCS- ; parmi les 117 contrôles, 74 sont des CCS- et 63 des CCS+ (Tableau 10). En outre, 14 pères ont des descendants à la fois dans les cas et dans les contrôles, 1 pour les CCS- et 13 pour les CCS+ (Tableau 10).

Tableau 10 : Description des animaux présents dans l'analyse binaire des abcès.

	CCS-		CCS+		Total	
abces	nb brebis	nb pères	nb brebis	nb pères	nb brebis	nb pères
Cas	2	2	18	14	20	16
Contrôles	72	19	45	20	117	39
Total	74	20	63	21	137	41
En commun	0	1	0	13	0	14

Deux SNP situés sur les chromosomes OAR5 et OAR24 sont significatifs au seuil de Bonferroni à 5% en considérant le génome complet (Figure 17).

Cinq SNP supplémentaires sont significatifs au seuil du chromosome. Les SNP significatifs sont situés sur des chromosomes différents : OAR1, OAR2, OAR5, OAR7, OAR8, OAR21 et OAR24 (Tableau 11 et Figure 18).

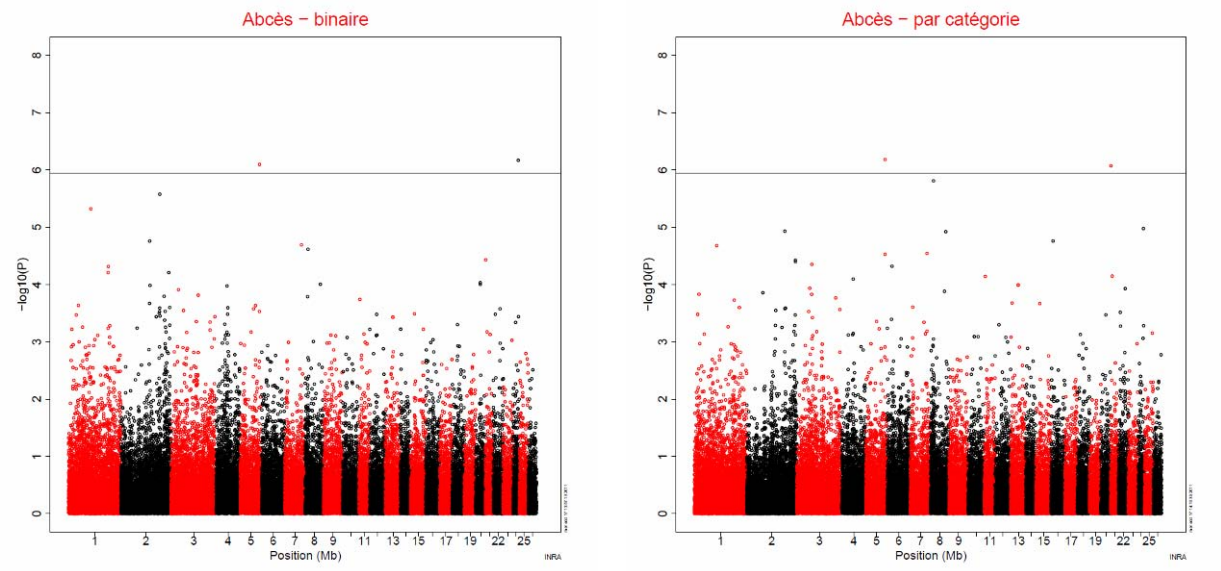


Figure 17 : Significativité de tous les SNP dans l'analyse binaire (à gauche) et catégorielle (à droite) des abcès. La ligne horizontale représente le seuil de Bonferroni à 5% au niveau du génome

Tableau 11 : Description des SNP significatifs dans l'analyse binaire des abcès.

OAR	Nom SNP	SNP	Position (b)	statistique	p-val	-LOG10(p)
1	OAR1_124151951.1	2066	115072520	115.07	4.77E-06	5.32
2	s32143.1	3616	192714888	192.71	2.65E-06	5.58
5	OAR5_104689497.1	1786	96700707	96.7	8.03E-07	6.1
7	OAR7_89580642.1	1536	82206557	82.21	2.03E-05	4.69
8	OAR8_16023103.1	272	14568118	14.57	2.43E-05	4.62
21	OAR21_2122576.1	17	1617993	1.62	3.71E-05	4.43
24	s41842.1	479	33340167	33.34	6.80E-07	6.17

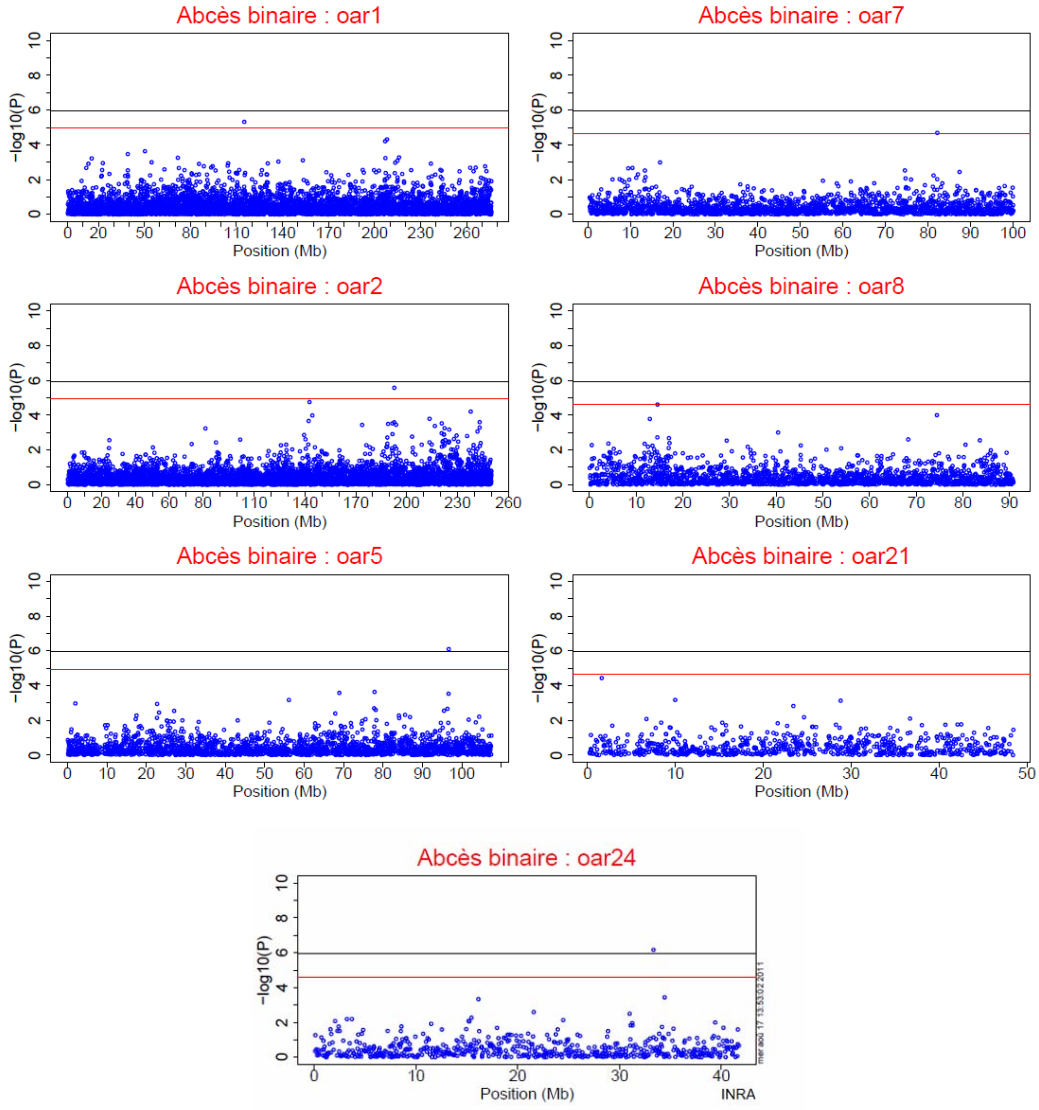


Figure 18 : Significativité des SNP dans l'analyse binaire des abcès sur les chromosomes OAR1, OAR2, OAR5, OAR7, OAR8, OAR21 et OAR24 qui possèdent chacun un SNP significatif. Les lignes noire et rouge représentent les seuils de significativité avec la correction de Bonferroni à 5% au niveau du génome et de chaque chromosome, respectivement.

3.2.2 Analyse catégorielle

L'étude du caractère « abcès mammaires » a été complétée par l'analyse d'un phénotype plus continu, basé sur le nombre réels d'abcès observés (Analyse 3). Les animaux sont décrits selon leur lignée d'origine et le nombre d'abcès dans le Tableau 12. Ainsi, 61 % des brebis sans abcès sont issues de la lignée CCS-, alors que 86 % des brebis avec plus de trois abcès appartiennent à la lignée CCS+. Un même père a des descendances dans plusieurs classes de la variable *abces* car la somme du nombre de pères de chaque classe par lignée est supérieure au nombre de pères fondateurs de cette lignée (26 vs 20 en CCS- et 47 vs 21 en CCS+) (Tableau 12).

Tableau 12 : Description des animaux présents dans l'analyse catégorielle des abcès.

	CCS-		CCS+		Total	
abces	nb brebis	nb pères	nb brebis	nb pères	nb brebis	nb pères
0	72	19	45	20	117	39
1	2	2	7	5	9	7
2	3	3	7	6	10	9
3	2	2	5	5	7	7
4	1	1	4	3	5	4
5	0	0	10	8	10	8
Somme	80	26	78	47	158	74
Nb Total	80	20	78	21	158	41

Deux SNP situés sur les chromosomes OAR5 et OAR21 sont significatifs au seuil de Bonferroni à 5% au niveau du génome (Figure 17, Tableau 14).

Le modèle de régression polygénique permet d'identifier quatre SNP significatifs supplémentaires. Les SNP significatifs sont situés sur OAR5, deux sur OAR8, OAR16, OAR21 et OAR24 (Tableau 13 et Figure 19).

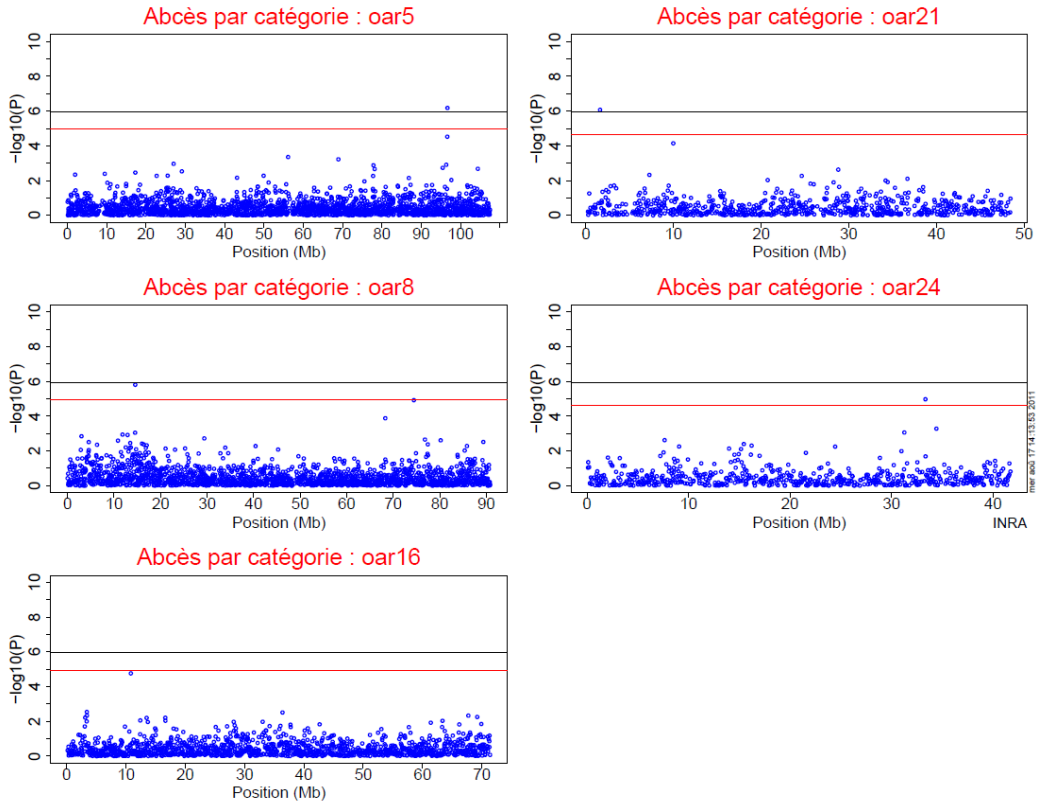


Figure 19 : Significativité des SNP dans l'analyse binaire des abcès sur les chromosomes OAR5, OAR8, OAR16, OAR21 et OAR24 qui possèdent chacun un SNP significatif. Les lignes noire et rouge représentent les seuils de significativité avec la correction de Bonferroni à 5% au niveau du génome et de chaque chromosome, respectivement.

Tableau 13 : Description des SNP significatifs dans l'analyse catégorielle des abcès

OAR	Nom SNP	SNP	Position (b)	statistique	p-val	-LOG10(p)
5	OAR5_104689497.1	1786	96700707	96.70	6.58E-07	6.18
8	OAR8_16023103.1	272	14568118	14.57	1.55E-06	5.81
8	s33616.1	1415	74426230	74.43	1.19E-05	4.92
16	s21645.1	191	10821086	10.82	1.74E-05	4.76
21	OAR21_2122576.1	17	1617993	1.62	8.49E-07	6.07
24	s41842.1	479	33340167	33.34	1.06E-05	4.98

4 Discussion

Similarités et différences entre les deux analyses des abcès (binaire ou par classe)

Quatre SNP sont significatifs dans l'analyse des abcès binaire et par catégorie. Il s'agit de marqueurs situés sur quatre chromosomes différents : OAR5, OAR8, OAR21 et OAR24.

Les SNP significatifs sur OAR8, OAR21, OAR24 sont isolés, *ie* les SNP situés à proximité de ces SNP ont des valeurs de signification faibles (Figure 18 et Figure 19). Il est donc difficile d'exploiter l'information de ces SNP, car il existe un risque non négligeable que ces SNP soient faussement positifs.

En revanche, quatre SNP situés à proximité du SNP significatif du chromosome OAR5 ont des p-values supérieures aux valeurs moyennes à proximité (Figure 18, Figure 19, et Tableau 14). Il semble donc que cette zone présente un réel intérêt pour expliquer les différences entre brebis avec abcès et brebis saines. Nous avons donc examiné les fréquences des génotypes de ces quatre SNP chez les cas (brebis atteintes) et les contrôles (brebis saines) (Tableau 15).

Tableau 14 : Description des 4 SNP situés à proximité du SNP significatif sur OAR5. Les valeurs de significativité ($-\log_{10}(p)$) sont présentées pour le phénotype dans les analyses binaire et catégorielle des abcès. Le numéro du SNP correspond à son numéro sur OAR5.

Nom SNP	SNP	Position (b)	Analyse binaire	Analyse par catégorie
s75197.1	1758	95487138	2.55	2.73
OAR5_104356628.1	1778	96379353	2.66	2.91
OAR5_104648879.1	1785	96653755	3.53	4.53
OAR5_104689497.1	1786	96700707	6.10	6.18

Tableau 15 : Fréquences génotypiques des 4 SNP situés à proximité du SNP significatif sur OAR5 dans l'analyse binaire des abcès. Le numéro du SNP correspond à son numéro sur OAR5. Les fréquences des SNP hétérozygotes sont en gras.

		Cas					Contrôles				
Nom SNP	SNP	AA	**AC**	**AG**	CC	GG	AA	**AC**	**AG**	CC	GG
s75197.1	1758	0.05	**0.25**		0.70		0.01	**0.05**		0.94	
OAR5_104356628.1	1778	0.05		**0.40**		0.55	0.01		**0.13**		0.86
OAR5_104648879.1	1785	0.70		**0.25**		0.05	0.97		**0.03**		0.01
OAR5_104689497.1	1786	0.05		**0.30**		0.65			**0.03**		0.97

Pour le SNP1786 qui correspond au SNP significatif, 97% des contrôles sont de génotype homozygote (GG) contre seulement 65% chez les cas et 3% sont hétérozygotes contre 30% chez les cas. Le génotype homozygote AA n'apparaît que chez les cas pour 5% des effectifs (Tableau 15).

Pour le deuxième SNP le plus significatif dans cette zone (SNP1785) et voisin du SNP précédent, la répartition des homozygotes et hétérozygotes est similaire (Tableau 16). Globalement, on remarque que pour les quatre SNP les plus significatifs dans cette zone de 1,21 Mpb (Méga paires de bases), il existe un génotype homozygote dominant chez les contrôles dont la fréquence est supérieure à 85%, et que la fréquence des hétérozygotes est toujours plus élevée chez les cas que chez les contrôles (au moins + 0,20) (Tableau 15).

Tableau 16 : Fréquences génotypiques des 4 SNP situés à proximité du SNP significatif sur OAR5 dans l'analyse catégorielle des abcès. Le numéro du SNP correspond à son numéro sur OAR5. Les fréquences des SNP hétérozygotes sont en gras.

SNP	Abces 3 =0 (n=117)					Abces 3 = 1 (n=9)					Abces 3 = 2 (n=10)				
SNP	AA	**AC**	**AG**	CC	GG	AA	**AC**	**AG**	CC	GG	AA	**AC**	**AG**	CC	GG
1758	0.01	**0.05**		0.94					1			**0.2**		0.8	
1778	0.01		**0.13**		0.86			**0.22**		0.78			**0.1**		0.9
1785	0.97		**0.03**		0.01	1					0.8		**0.2**		
1786			**0.03**		0.97					1					1

SNP	Abces 3 = 3 (n=7)					Abces 3 = 4 (n=5)					Abces 3 = 5 (n=10)				
SNP	AA	**AC**	**AG**	CC	GG	AA	**AC**	**AG**	CC	GG	AA	**AC**	**AG**	CC	GG
1758		**0.29**		0.71			**0.2**		0.8		0.1	**0.3**		0.6	
1778			**0.43**		0.57			**0.4**		0.6	0.1		**0.5**		0.4
1785	0.71		**0.29**			1					0.5		**0.4**		0.1
1786			**0.29**		0.71			**0.4**		0.6	0.1		**0.3**		0.6

L'étude des fréquences génotypiques sur la variable quantitative ***abces*** permet de confirmer ce résultat (Tableau 16). Les fréquences des SNP hétérozygotes (AC et AG) sont bien supérieures chez les brebis ayant plusieurs abcès (***abces = 3, 4 ou 5***) que chez celles n'en ayant pas (***abces = 0***) ; sauf pour le SNP 1785 qui est monomorphe chez les 5 brebis de la catégorie ***abces = 3***.

Comparaison des analyses sur les caractères abcès et lignées

Le SNP 1533 significatif dans l'étude de comparaison des lignées et le SNP 1536 significatif dans l'étude binaire des abcès sont situés à environ 106 000 pb sur le chromosome OAR7.

De même, des SNP significatifs pour les trois analyses (lignée, abcès binaire ou en catégorie) sont situés dans une même région du chromosome OAR 8. Il s'agit du même marqueur pour les analyses sur les abces (n° 272) et de deux marqueurs légèrement en amont dans l'analyse des lignées (n° 201 et 229, à 2,04 et 3.62 Mbp du n°272, respectivement).

Cependant même si certains signaux sont très forts et partiellement communs entre les caractères, ils restent assez isolés.

En résumé le principal résultat de cette étude d'association est l'étude des abcès avec l'importance de la zone située entre 95,49 et 96,70 Mpb sur le chromosome OAR5. En ce qui concerne les lignées, un signal fort est présent à 12,53 Mpb sur le chromosome OAR8, mais ce signal est isolé.

Comparaison des résultats de l'étude d'association et des gènes différemment exprimés entre les lignées

La méta-analyse des trois jeux de données a permis d'obtenir une liste de 509 gènes différemment exprimés entre les brebis de la lignée résistante et les brebis de la lignée sensible. Pour faire le lien avec les analyses d'association nous avons localisé les sondes du microarray Agilent sur le génome ovin.

Grâce à la collaboration avec l'équipe d'Alessandra Stella (Parco Tecnologico Padano, Milan), nous avons pu obtenir la localisation de 9182 (60,3%) sondes parmi les 15208 sondes existantes et de 339 (66,7%) sondes parmi les 509 identifiées dans la méta-analyse. Un tiers des gènes est situé sur les trois premiers chromosomes (OAR1 : 38, OAR2 : 27 et OAR3 :48), mais ces gènes représentent aussi un tiers de la longueur du génome (Annexe 2). La répartition des gènes significatifs n'est pas homogène tout au long du génome et des groupes de gènes co-localisés différentiels sont parfois mis en évidence. On peut principalement noter l'existence d'un cluster de 11 gènes sur OAR3 (dans 13,1 Mpb), de 5 gènes sur OAR19 (dans 3,6Mpb), de 5 gènes sur OAR26 (de 3,9Mpb), de 4 gènes sur OAR21 (de 4,2Mpb), de 3 gènes sur OAR23 (de 0,04Mpb), de 3 gènes sur OAR24 (de 0,09Mpb) et de 3 gènes sur OAR10 (de 0,25Mpb) (Tableau 17). Parmi ces clusters, celui situé sur OAR3 est de grande importance car le gène candidat fonctionnel TMEM87B est situé à 2,1 Mpb en amont. Le cluster sur OAR19 est aussi très intéressant car le gène SC5 qui fait partie des gènes les plus exprimés chez les brebis de la lignée résistante dans la méta-analyse et qui est un peptide microbien est situé dans ce cluster. On peut noter en particulier que les gènes du cluster identifié sur OAR21 sont tous plus exprimés chez les brebis de la lignée résistante et que ceux du cluster sur OAR 19 sont plus exprimés chez les brebis de la lignée résistante.

Ces clusters de gènes identifiés par les analyses microarray sont particulièrement intéressants car ils suggèrent qu'il existe un fonctionnement coordonné de ces gènes potentiellement lié à leur proximité sur le génome. On peut faire l'hypothèse qu'il existe une mutation proche de ces clusters qui affecterait l'expression de plusieurs gènes ou qu'il existe simplement une interaction biologique fonctionnelle. Pour la suite, il serait intéressant d'approfondir leur lien biologique.

Tableau 17 : Description des clusters de gènes différemment exprimés (méta-analyse)

Accession Number	OAR	Nb	Sonde Agilent	Gènes	Début	Fin	estimate	p-value
EE780570	OAR3		A_70_P057056	TMEM87B	106046632	106046691	-1.02	3.288E-06
TC25593			A_70_P001766	LUM	127247094	127247153	-0.23	0.00073974
NM_001009218			A_70_P030251	DCN	127290227	127290286	-0.35	0.0005622
NM_001009218			A_70_P030252	DCN	127290362	127290421	-0.23	0.00083509
EE751503			A_70_P048801	KRT77	133496405	133496464	0.22	0.00116715
EE837255			A_70_P056226	KRT80	133988494	133988553	0.17	0.00064111
EE749216	OAR3	11	A_70_P046331	BIN2	134742613	134742672	-0.26	0.00040439
TC43851			A_70_P007871	SLC11A2	134972945	134973004	-0.21	0.00114414
EE853909			A_70_P005586	ATF1	135331677	135331736	-0.16	0.00113098
TC35618			A_70_P043642	SLC38A2	139897667	139897726	-0.37	0.00014137
GT643031			A_70_P016241	SLC38A2	139898092	139898151	-0.38	0.00034193
EE749966			A_70_P043211	SRSF2IP	140317378	140317437	-0.17	5.5892E-05
EE777414			A_70_P063491	COMMD6	49235753	49235812	-0.29	0.00118359
NM_001082595	OAR10	3	A_70_P029971	CLN5	50787820	50787879	0.09	0.00028932
FE023619			A_70_P025906	EDNRB	51697024	51697083	-0.18	0.00152223
TC48656			A_70_P032561	RPL19	49023472	49023531	0.2	9.5345E-05
TC25081			A_70_P064696	CYB561D2	50084007	50084066	0.14	0.00044385
NM_001009754			A_70_P051246	HYAL2	50116037	50116096	0.16	0.00074632
FE037552	OAR19	7	A_70_P066096	NICN1	50787575	50787634	0.11	0.0013414
EE827538			A_70_P069896	WDR6	51073076	51073135	0.17	0.00046357
NM_001009406			A_70_P030426	SC5	51720032	51720091	0.65	6.575E-06
EE818067			A_70_P055126	NBEAL2	52575580	52575639	0.17	0.00100934
TC33017			A_70_P047331	PLA2G16	39669594	39669653	0.22	0.00059179
DY499598			A_70_P048061	PLCB3	40314729	40314788	0.11	0.00147291
EE819915	OAR21	4	A_70_P028361	CORO1B	43085740	43085799	0.17	0.00156497
NM_001009414			A_70_P051281	CPT1A	43944210	43944269	0.11	0.00027946
EE816120			A_70_P024901	RALBP1	42191880	42191939	0.19	0.00104879
EE792488	OAR23	3	A_70_P018496	RALBP1	42215040	42215099	0.17	0.00091399
EE830989			A_70_P062276	PPP4R1	42236121	42236180	-0.13	0.00112112
FE028060			A_70_P066591	ZNF3	36394202	36394261	0.1	0.00163072
EE784106	OAR24	3	A_70_P057336	NonAnnotated	36515087	36515146	0.28	0.00012822
NM_001129904			A_70_P017026	CYP3A24	36668648	36668707	-0.27	0.00160771
EE786805			A_70_P052991	ERLIN2	31629790	31629849	0.14	0.00165702
CN822074			A_70_P029426	EIF4EBP1	31878269	31878328	0.26	0.00150579
FE023444	OAR26	5	A_70_P025856	ADAM9	32820532	32820591	-0.21	0.00099619
EE793611			A_70_P042706	GINS4	34952842	34952901	0.18	0.00050303
TC33239			A_70_P053411	PLAT	35527486	35527545	-0.75	0.0002137

Ensuite dans un deuxième temps nous avons couplé ces résultats de localisation génomique des gènes différentiellement exprimés aux résultats des études d'association présentés précédemment.

Les 4 SNP pour lesquels nous avons étudié les fréquences génotypiques sont situés entre 95,49 et 96,70 Mpb sur OAR5. Or à proximité de ce gène (94,05 Mpb), se trouve le gène CAST qui a été identifié dans la méta-analyse par deux sondes différentes. Le gène CAST est un inhibiteur de la calpain, or le gène CAPN3 est plus exprimé dans les CSL des brebis de la lignée résistante. Mais son rôle n'est pas encore bien connu et aucun lien avec la formation des abcès n'a été établi. Il serait donc intéressant de séquencer le gène de plusieurs animaux avec beaucoup d'abcès ou sans abcès pour vérifier si un polymorphisme dans ce gène est directement associé au phénotype.

En ce qui concerne les résulats de l'appartenance aux lignées, le gène TPBG est situé à 1,5 Mpb du SNP significatif sur OAR8. Ce gène est une glycoprotéine transmembranaire qui est impliquée dans l'adhésion cellulaire et il est plus exprimé chez les brebis de la lignée sensible. La selection basée sur les CCS aurait donc pu porter, en partie, sur la sélection d'animaux porteurs de mutations sur ce gène.

Sur le génome ovin quatre gènes sont situés à proximité du SNP 1786 sur OAR5, il s'agit de CHD1, RGMB, TMEM157 et ST8SIA4. Parmi ces gènes, deux sont présents sur la puce Agilent, leur expression a donc été mesurée dans les échantillons (CHD1 et ST8SIA4), mais elle n'était pas différentielle entre les lignées. L'expression des deux autres gènes n'a pas été mesurée dans les échantillons, il pourrait être intéressant de les mesurer. TMEM157 est une protéine membranaire dont le rôle n'est pas connu et RGMB est impliqué dans le développement du système nerveux. Il est difficile de faire le lien entre les gènes présents à proximité du SNP significatif et la formation des abcès.

Les gènes HINT3 et NKAIN2 sont situés sur OAR8 à proximité du SNP 229 et du SNP 272, respectivement. Ces deux gènes ne sont pas présents sur la puce Agilent. HINT3 est une hydrolase et transférase de nucléotides et NKAIN2 est une protéine membranaire qui interagit avec ATP1B1, une ATPase. Mais il est difficile d'établir une relation entre ces gènes et la sélection sur les CCS ou la formation des abcès.

Les gènes TP53 et AHR candidats fonctionnels pour expliquer les différences entre les deux lignées de brebis sont situés sur OAR11 et OAR4, respectivement. Mais aucun SNP significatif n'était situé sur ces deux chromosomes. Les analyses de polymorphisme ne permettent pas de confirmer que ces deux gènes sont des bons gènes candidats pour expliquer les différences de sensibilité aux IMI.

En résumé, les analyses d'association ont permis de mettre en évidence deux zones zone chromosomique d'intérêt, sur OAR5 et OAR8, qui semblent déterminer certaines composantes de la résistance aux mammites, et plus particulierement la formation d'abcès. Si des liens existent avec les gènes différemment exprimés des analyses transcriptmomiques, ils ne sont pas évidents et leur étude mériterait d'être approfondie.

CHAPITRE IV : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le déterminisme génétique de la résistance aux mammites des ruminants laitiers est étudié depuis de nombreuses années. Au vu de la littérature, on peut supposer que le fond génétique de l'hôte intervient dans le contrôle de cette maladie infectieuse. L'amélioration génétique se présente donc comme une approche complémentaire du dispositif existant pour contrôler les IMI (vaccins, antibiotiques). Plusieurs approches ont été développées pour améliorer la résistance aux IMI : la sélection classique sur l'index SCS et/ou « mammites cliniques » et plus récemment l'utilisation conjointe de données moléculaires, que ce soit par la sélection assistée par marqueurs (par l'identification de QTL) ou par la sélection génomique. Bien que la sélection sur les index SCS soit largement mise en œuvre chez les ruminants laitiers à travers le monde, les mécanismes biologiques activés par une telle sélection restent peu connus. Ainsi, dans notre étude, des brebis laitières de race Lacaune ont été sélectionnées sur l'index SCS de leurs pères (Rupp et al. 2009). L'index SCS repose sur les SCS des filles fortement corrélés au diagnostic bactériologique des IMI. Il représente donc un critère pertinent pour évaluer la résistance aux IMI. Cette expérience est, à notre connaissance, l'une des premières à étudier de façon détaillée la réponse à des infections à *Staphylococcus* chez des animaux dont les aptitudes génétiques sont caractérisées et clairement différentes. L'équipe de Schwerin a développé deux modèles chez la vache laitière pour répondre à la même question. Dans l'un des modèles, les vaches étaient sélectionnées sur leurs allèles à un QTL associé aux SCS sur le chromosome BTA18 (Kuhn et al. 2008). Dans le second modèle, les vaches étaient sélectionnées sur des SCS extrêmes. Il est probable que le peu de résultats obtenus sur l'expression de quelques cytokines mesurées par qPCR dans ce deuxième modèle (Griesbeck-Zilch et al. 2009) ait dissuadé ces chercheurs à approfondir le modèle par des analyses de microarray (Brand et al. 2011).

En nous intéressant au modèle de lignées divergentes sélectionnées sur l'index SCS, nous travaillons sur un caractère surement plus polygénique qu'avec une sélection sur un seul QTL. Cela peut être considéré comme un désavantage car l'analyse en est plus complexe, mais notre modèle a l'avantage de représenter une approche plus complète du déterminisme génétique, contrairement à l'étude d'un QTL qui n'explique qu'un faible pourcentage de la variabilité génétique. De plus, nous avons tenté d'appréhender la réponse de l'hôte dans sa globalité, en ne nous intéressant pas uniquement aux CEM, mais en complétant l'étude par des analyses *in vivo* des CSL et *in vitro* des CD. Tout d'abord, nous avons choisi par simplification d'étudier la réponse d'un type cellulaire pris isolément plutôt que la réponse du tissu tout entier, après stimulation par un agent pathogène. Ces analyses sur un type cellulaire donné ne permettent pas d'envisager la réponse globale de l'hôte, mais seulement d'identifier les modalités de la réponse de cette cellule. L'étude *in extenso* de la réponse de l'hôte à une IMI *in vivo* pose un certain nombre de difficultés. Les divers événements de la réponse suivent des cinétiques différentes, et dans plusieurs organes simultanément (glande mammaire, foie, tissu adipeux). Le prélèvement de certains de ces tissus requiert l'abattage de l'animal ou des moyens difficiles à mettre en œuvre techniquement ; ainsi l'établissement d'une cinétique de réponse est difficile *in vivo*. C'est pourquoi i) nous nous sommes concentrés sur les réponses de la glande mammaire à travers l'analyse des CSL qui sont faciles à prélever et ; ii) nous avons étudié *in vitro* la réponse des CD et des CEM à des infections à *Staphylococcus* pour pouvoir effectuer des prélèvements en suivant la cinétique de réponse. L'outil microarray nous a permis d'analyser les variations d'expression de nombreux gènes entre les échantillons. Les mécanismes biologiques ont été identifiés soit pour un type particulier de cellules (Chapitre III, Parties 1 à 3), soit pour l'ensemble des cellules lors de la méta-analyse (Chapitre III, Partie 4). Cette approche, même si elle ne remplace pas l'analyse d'un tissu qui considère aussi les interactions entre types cellulaires, permet de décomposer les mécanismes mis en jeux dans les différents compartiments/types cellulaires qui participent à la réponse de l'hôte.

Les lignées de brebis ont été sélectionnées sur la réponse inflammatoire à travers les CCS, il n'est donc pas étonnant d'identifier des différences entre les deux lignées basées sur des mécanismes de l'inflammation. Alors que les analyses monocellulaires n'avaient pas révélé de différences pour les gènes spécifiant des cytokines du processus inflammatoire, la méta-analyse a permis d'en identifier trois : TNFa, IL-1a et IL-10. Les gènes de ces trois cytokines sont plus fortement exprimés chez les brebis de la lignée sensible. Ces résultats pourraient paraître contradictoires car TNFa et IL-1a sont des cytokines pro-inflammatoires, alors que IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire. En début d'infection IL-10 peut avoir un rôle préjudiciable, en empêchant la réponse inflammatoire de se mettre en place, alors qu'en fin d'infection, elle permet de revenir à un niveau basal. Les résultats bibliographiques sur l'expression de ces cytokines dans des contextes d'infection sont nombreux. L'expression de *tnfa* est augmentée dans les CSL (Riollet et al. 2001; Alluwaimi et al. 2003; Lee et al. 2006), les macrophages (Taraktsoglou et al. 2011) et les CEM infectées (Griesbeck-Zilch et al. 2008; Lahouassa et al. 2007; Lutzow et al. 2005), ainsi que celle d'*il-1a* dans des épithéliums infectés (Griesbeck-Zilch et al. 2008; Moreilhon et al. 2005). Au contraire *il-10* est plus exprimée dans des CSL saines que dans des CSL infectées (Peli et al. 2003). Par ailleurs, TNFa et IL-1a ont un rôle primordial dans le développement des abcès (Kielian et al. 2004). Leur expression supérieure chez les brebis de la lignée sensible pourrait expliquer la fréquence d'abcès plus élevée dans les tissus mammaires des brebis de cette lignée suite à des infections expérimentales (cf paragraphe 1.2) ainsi que dans des conditions naturelles d'élevage (Rupp et al. 2009). L'équipe de Schwerin a montré que la réponse inflammatoire était activée après stimulation dans les deux groupes de vaches sélectionnées sur QTL (BTA18) avec l'activation des voies « acute phase response signalling » et « TNFR1 signalling » (Brand et al. 2011). Toutefois, il semble que l'inflammation soit plus forte chez les vaches résistantes car d'autres voies telles que « TNFR2 signalling » et « NFkB signalling » sont également mobilisées. Dans notre méta-analyse, les données proviennent de différentes cellules avec des temps de stimulation différents. Pour clarifier l'implication des cytokines inflammatoires dans nos deux lignées, il serait important d'étudier les cinétiques d'expression de ces différentes molécules au cours du temps. Par exemple, nous pourrions phénotyper un plus grand nombre de brebis de chaque lignée, en mesurant l'expression des principales cytokines identifiées ici (IL-1a, TNFa et IL10) ainsi que d'autres cytokines IL8, IFNg après une stimulation à *S. aureus*. Deux niveaux de mesure pourraient être utilisés, une RT-PCR pour mesurer la concentration d'ARN et une ELISA pour mesurer la concentration protéique. Ces analyses pourraient être effectuées sur des PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*) car ils peuvent être recueillis facilement par une prise de sang, isolés, puis stimulés *in vitro*. Cette expérience a l'avantage de pouvoir être mise en place sur un grand nombre d'animaux à moindre coût en comparaison aux analyses de microarray.

Les modifications de réponses des brebis des deux lignées divergentes s'expliquent aussi par des différences dans certaines voies de transduction. Par exemple, dans l'analyse des CSL, la surexpression de TLR2 et de deux gènes de la voie MAPK-ERK chez les brebis de la lignée résistante nous avait conduits à conclure à une activation des voies de transduction par MAPK chez ces brebis. Bien que cette voie ne soit pas identifiée dans les analyses des CD et des CEM, la méta-analyse indique qu'elle est plutôt activée chez les brebis de la lignée

sensible avec quatre gènes plus fortement exprimés dans cette lignée (les gènes impliqués sont différents de ceux identifiés dans les CSL).

L'activation de la voie MAPK-ERK est déclenchée par de nombreux récepteurs, tels que les TLR, IL-1R, IL-17RA et TNFa (Figure 20, Froy 2005) et elle entraîne des processus inflammatoires par l'intermédiaire de NFκB (Figure 20) qui peuvent activer ou inhiber un gène. Or ces interactions ne peuvent pas être évaluées au niveau transcriptionnel. Il a été montré chez la chèvre qu'une infection à *S. aureus* entraînait des modifications de la voie des MAPK dans les CSL au cours du temps, avec à la fois l'activation de certains gènes et l'inhibition d'autres gènes (Pisoni et al. 2010). Ainsi, les voies de transduction des signaux sont des mécanismes extrêmement complexes dont il est difficile de préciser le rôle exact dans les différences de réponse aux IMI chez les brebis de la lignée résistante et chez celles de la lignée sensible.

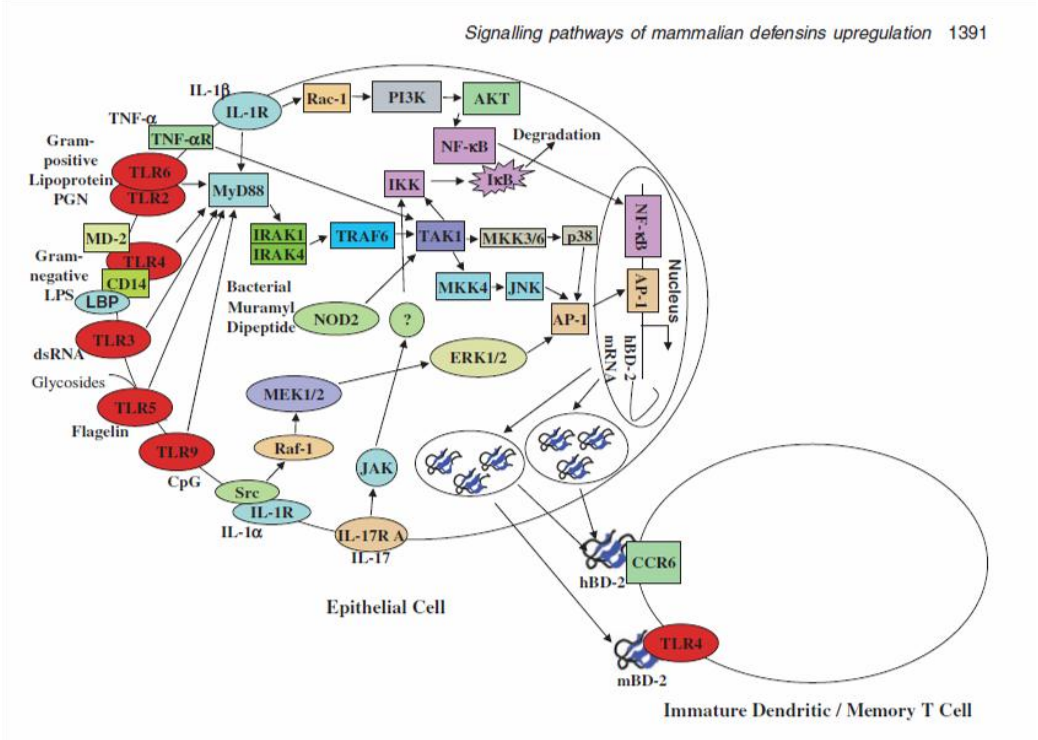


Figure 20 : Voies de signalisation à partir des récepteurs TLR et d'autres récepteurs (Froy 2005)

En parallèle des réponses inflammatoires et de leur signalisation intracellulaire, des modifications d'expression de gènes activés dans la migration des cellules immunitaires et principalement dans le recrutement des neutrophiles sont observées. Les résultats sont cependant peu concordants et varient en fonction du type cellulaire étudié. Alors que les analyses des CSL suggèrent une adhésion plus forte des neutrophiles aux cellules endothéliales chez les brebis de la lignée résistante, celles des CD et des CEM indiquent que la migration des cellules immunitaires serait plus intense chez les brebis de la lignée sensible. Or, le recrutement des neutrophiles est activé par la sécrétion de certaines cytokines ou chimiokines attractantes. Dans nos analyses, aucune cytokine n'a été identifiée comme différentielle entre les lignées, à l'exception d'*il-8*, la principale cytokine liée au recrutement des neutrophiles (Vetillard et al. 1999) dont l'expression était légèrement supérieure dans les CEM des brebis de la lignée sensible dans les analyses microarray, mais dont l'expression n'a pas été validée en RT-qPCR. La fonction de migration des neutrophiles est aussi mise en

évidence dans le modèle des vaches sélectionnées sur le QTL BTA18 avec l'activation au cours du temps de 10 gènes chez les vaches sensibles (dont *ccl5*, *il-8*, *nfκbia*, et plusieurs molécules du type *cxc*) et de 18 gènes chez les vaches résistantes (dont 3 *ccl*, 3 *cxc*, *il-1b*, *nfκbia* et 2 *s100a*) dans la culture primaire de CEM (Brand et al. 2011). Le recrutement des neutrophiles n'a pas pu être évalué dans ce modèle *in vitro* utilisant uniquement des CEM. Mais cette étude souligne le fait que des voies légèrement différentes sont activées chez les vaches résistantes et les vaches sensibles, ce qui d'une certaine façon, corrèle nos résultats. La diapédèse peut être étudiée *in vitro* en utilisant des chambres de Boyden (Clark et Kimball 1971) ou plus récemment des chambres de culture poreuses ou transwell en utilisant des cellules isolées du sang. Nous avons testé cette approche au laboratoire sur quelques échantillons, mais nous n'avons pas réussi à montrer de différence entre les lignées.

Dans l'analyse des CSL, onze gènes impliqués dans l'apoptose sont plus exprimés chez les brebis de la lignée résistante. Dans les deux autres types cellulaires, ainsi que dans la méta-analyse, les fonctions associées à la mort cellulaire ne semblent pas être différentes entre les brebis des deux lignées, même si ces fonctions sont fortement mobilisées selon la nature et la durée de la stimulation dans les essais utilisant des CEM. Ainsi l'apoptose, identifiée uniquement dans les cellules somatiques du lait, semble jouer un rôle important chez les brebis de la lignée résistante. Même si les neutrophiles sont des cellules importantes pour phagocyter et éliminer les bactéries, ils ont aussi la capacité de provoquer des dommages collatéraux dans le tissu mammaire. Après leur mort par apoptose, ils sont phagocytés par les macrophages qui éliminent les débris cellulaires et diminuent ainsi l'inflammation (Paape et al. 2003). L'apoptose est donc un mécanisme utile qui permet d'éviter les dégâts infligés au tissu mammaire par le contenu des neutrophiles sénescents. A partir du constat que les neutrophiles du lait entrent en apoptose plus facilement chez les brebis de la lignée résistante, une hypothèse peut être émise : l'apoptose plus efficace dans les neutrophiles des brebis résistante pourrait être responsable à la fois d'une diminution plus rapide des CCS après l'infection et d'une détérioration moindre du tissu mammaire. Toutefois, ces observations reposent sur un point unique de prélèvement (12h après l'infection) et doivent être considérées avec prudence. Il faut donc nuancer le résultat précédent par le fait qu'il peut exister des décalages dans le temps des mécanismes entre les deux lignées de brebis. Pour étudier ce mécanisme plus en détail, il serait intéressant d'évaluer plus finement la cinétique du recrutement des CSL et des phénomènes d'apoptose. Cependant les populations cellulaires du lait dépendent de l'état infectieux de la glande mammaire et varient donc fortement au cours de l'infection (Paape et al. 2002). Ainsi il n'est pas pertinent d'établir une cinétique des CSL pour étudier l'évolution du transcriptome des neutrophiles dans le temps. Il a été montré chez la chèvre que des gènes prévenant l'apoptose étaient activés au cours d'une infection à *S. aureus* dans les CSL (Pisoni et al. 2010). De même, chez la vache l'apoptose des neutrophiles du lait est retardée dans les quartiers infectés par *S. aureus* (Sladek et al. 2005). Ainsi, il est possible que chez les brebis de la lignée résistante, les neutrophiles phagocytent plus vite les bactéries et que les programmes de mort cellulaire s'enclenchent plus rapidement.

La phagocytose et l'activité bactéricide de certaines cellules sont aussi des mécanismes de première importance pour expliquer la résistance aux mammites. La méta-analyse a permis de proposer un gène candidat, *sc5* qui fait partie des gènes les plus exprimés chez les brebis de la lignée résistante. Ce gène spécifie un peptide antimicrobien qui

appartient à la famille des CAMP (*cathelicidin antimicrobial peptide*). Les cathélicidines sont des molécules du système immunitaire inné qui agissent dans l'élimination des bactéries Gram positive ou Gram négative (Brogden et al. 2003). Elles sont uniquement présentes dans les quartiers infectés (Smolenski et al. 2011). Il semblerait que les cathélicidines aient aussi une activité chimio-attractante pour les neutrophiles (Agerberth et al. 2000). Leur concentration augmente parallèlement au développement de l'IMI et elle est fortement corrélée au SCS en début d'infection (Smolenski et al. 2011). Ainsi, les cathélicidines pourraient être utilisées comme des biomarqueurs précoces pour détecter une IMI ou pour déterminer l'état d'infection (Smolenski et al. 2011). L'expression plus élevée de *sc5* chez les brebis de la lignée résistante pourrait donc constituer une des composantes du meilleur contrôle de la quantité de bactéries que nous avions observé chez les brebis de la lignée résistante suite à l'infection expérimentale par *S. aureus*. Pour confirmer les différences d'expression des peptides antimicrobiens, il serait utile de mesurer la quantité du peptide SC5 dans le lait chez les brebis des deux lignées après inoculation de *S. aureus* pour mieux évaluer son rôle et l'existence de cette différence.

Outre les différentes voies qui sont modifiées entre les lignées, ces travaux permettent de proposer des gènes candidats fonctionnels pour expliquer les différences de sensibilité aux mammites. Le gène *ahr* a été identifié à plusieurs reprises dans ces expériences. Il est plus fortement exprimé chez les brebis de la lignée sensible dans les CSL et dans les résultats de la méta-analyse. La voie à laquelle il est associé est modifiée avec une majorité de gènes plus exprimés dans les CD des brebis de la lignée sensible. AHR a la capacité de reconnaître des motifs de séquence et de réguler 33 gènes différemment exprimés entre les lignées dans les CSL, ainsi que 20% des gènes qui sont regroupés chez les brebis de la lignée résistante dans la deuxième méta-analyse ; ces gènes peuvent être soit activés soit réprimés. AHR est associé à la différenciation des cellules Th17 (Veldhoen et al. 2008), mais les mécanismes de cette différenciation ne sont pas clairs et diffèrent selon les auteurs (Stockinger et al. 2011). Au contraire le gène TP53 est plus exprimé chez les brebis de la lignée résistante dans l'analyse des CSL et dans la méta-analyse. Les voies associées sont significativement modifiées dans la méta-analyse ; les analyses de réseaux de gènes ont montré qu'il a de nombreuses interactions avec des gènes différemment exprimés entre les deux lignées de brebis dans l'analyse des CSL et des CEM. TP53 a été principalement étudié dans un contexte cancéreux mais très peu dans un contexte infectieux. De façon intéressante, il a été associé à AHR dans une étude sur le cancer (Su et al. 2009). D'après les analyses transcriptomiques, ces deux gènes jouent un rôle important pour différencier les brebis des deux lignées, de par leur capacité à réguler ou du moins à interagir avec de nombreux gènes différemment exprimés entre les lignées. Ces deux gènes sont donc de bons gènes candidats fonctionnels et nous formulons l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de AHR conjointe à l'activation de TP53 participe à diminuer la sensibilité aux infections à *Staphylococcus* chez les brebis de la lignée résistante. Il serait intéressant de mesurer l'expression de ces deux gènes sur de nouveaux échantillons au niveau des ARNm et des protéines et de vérifier cette hypothèse dans un autre modèle biologique. Par exemple, en utilisant un agoniste de AHR ou un antagoniste de TP53 chez des souris résistantes ou sensibles aux infections à *S. aureus* et en évaluant les modifications de réponse.

Parmi les gènes différentiels, le gène *tmem87b* était plus exprimé chez les brebis de la lignée sensible dans l'analyse des CSL et des CD. Jusque là nous n'y avions pas prêté beaucoup d'attention car il existe très peu de données sur la fonction de ce gène (ou ses interaction avec d'autres gènes), mais dans la méta-analyse il fait également partie des gènes les plus exprimés chez les brebis de la lignée sensible. La seule information connue est qu'il

spécifie une protéine membranaire. Pour connaître son rôle, il serait utile de le cloner et de caractériser ses propriétés d'abord dans des modèles cellulaires *in vitro* puis dans un organisme entier.

Pour la suite du projet, il serait pertinent i) de mesurer l'expression de *tp53, ahr, tmem87b* et *sc5* dans des PBMC stimulés avec *S. aureus* au niveau transcriptionnel et protéique sur un grand nombre de brebis et ii) si les résultats confirment l'activation de *tp53* et *sc5* et l'inhibition de *ahr* et *tmem87b* chez les brebis de la lignée résistante, de séquencer les régions portant ces gènes sur des brebis extrêmes (le choix de ces animaux est détaillé ci-dessous dans le cadre du projet 3SR).

Les résultats précédents ont été obtenus à partir d'analyses transcriptomiques réalisées sur des cellules issues de trois expériences différentes, mais nous sommes conscients de quelques limites à l'extrapolation de ces résultats. Lorsque nous comparons les réponses des CSL à *S. epidermidis* et à *S. aureus*, d'autres effets sont confondus (1ère vs 2ème lactation, âgé de 1 vs 2 ans, 0 vs 1 infection préalable) et ces effets ne peuvent pas être dissociés de l'effet de l'agent pathogène. Mais ce modèle a l'avantage de faciliter la comparaison en stimulant les mêmes brebis avec les deux bactéries, sans créer de variabilité interindividuelle supplémentaire.

Dans le cadre de l'analyse des CD, celles-ci ont été différenciées *in vitro* à partir de cellules souches de la moelle osseuse en présence de GM-CSF. Les marqueurs CD11b et CD11c ont été mis en évidence, ce qui confirme que la population étudiée correspond bien à des cellules dendritiques. Toutefois, il existe plusieurs sous-populations des CD et il est difficile de les classer exactement. Par ailleurs, il n'existe pas de données sur les sous-populations de CD présentes dans le tissu mammaire. Toujours est-il que les CD partagent 90% des gènes exprimés avec les macrophages (Geissmann et al. 2010), et constituent donc une première évaluation de cette catégorie de cellules.

En ce qui concerne l'étude des CEM, contrairement au modèle bovin (Kuhn et al. 2008), dans lequel les principales cytokines et chimiokines ont des niveaux d'expression qui varient entre les vaches résistantes et sensibles (Griesbeck-Zilch et al. 2009), nous n'avons mis en évidence que très peu de gènes différentiels entre les lignées de brebis. Quels sont les facteurs qui peuvent expliquer cette différence de résultats ? Il est possible que l'origine de ces différences soit d'abord d'ordre technique. La culture des CEM ovines était très homogène. Il est possible que dans les cultures bovines d'autres types cellulaires non caractérisés soient présents ; ainsi un type cellulaire contaminant pourrait influencer les résultats obtenus. Une deuxième explication peut provenir des modèles expérimentaux. Peut-être que les CEM bovines et ovines ne réagissent pas de la même manière *in vitro*. Peut-être que la sélection des brebis et des vaches n'a pas porté sur les mêmes gènes et qu'elle ne se traduit pas par les mêmes activités des CEM.

Ainsi, même si ces trois expériences ont chacune leurs spécificités, elles permettent d'avoir une vision décomposée de la réponse de la glande mammaire aux infections à *Staphylococcus,* dont la globalisation a été appréhendée dans une méta-analyse. L'étape suivante de notre étude pourrait être une stimulation *in vitro* de tissus mammaires avec un suivi régulier de la réponse afin de prendre en compte les interactions entre cellules qui

peuvent fortement modifier les réponses de chaque type de cellules. Toutefois, dans les échantillons de tissu, les proportions de cellules peuvent varier d'un échantillon à l'autre et entraîner non pas des modifications de réponse d'un type cellulaire, mais une modification des cellules en présence.

Dans les deux approches *in vitro*, nous nous sommes focalisés sur des durées de stimulation ou d'infection courtes (0-8h pour les CD et 0-5h pour les CEM). D'autres études, principalement sur les CEM bovines, ont été prolongées jusqu'à 24h après le début de la stimulation ou de l'infection. Pour pouvoir étudier les réponses cellulaires au niveau des transcrits par la technique de microarray, il est nécessaire de disposer d'un ARNm de bonne qualité et non dégradé (RIN>8). Cela nécessite des cellules intactes et vivantes. Or, une stimulation d'une durée de 24h, en particulier lorsqu'elle utilise des bactéries vivantes, conduit à la mort d'une partie des cellules à cause des toxines libérées par les bactéries, et donc à une certaine dégradation de l'ARNm. Toutefois, une stimulation soit à l'aide de composés bactériens, soit avec des bactéries rendues inactives par la chaleur par exemple peut permettre de simuler une infection bactérienne en déclenchant les processus de réponse, tout en limitant les effets toxiques sur les cellules. Alors que cette alternative est séduisante pour l'étude des réponses *in vitro*, nous avons constaté que les stimulations avec des bactéries vivantes ou leur surnageant de culture ne conduit pas à l'activation ou l'inhibition des mêmes fonctions cellulaires.

De plus, les analyses de microarray grâce à leur capacité à mesurer l'expression de milliers de gènes simultanément sont des outils précieux pour les analyses d'interaction hôtes-agents pathogènes. Toutefois, il faut être conscient de certains biais techniques lors de leur utilisation. Au moment de l'hybridation des échantillons, une quantité constante d'ARN est déposée sur le microarray. Or, elle peut être extraite d'un nombre parfois très différent de cellules, ce qui peut cacher ou déformer certains aspects de la réalité. La mesure effectuée pour chaque gène lors d'une analyse de microarray correspond à une intensité de fluorochrome ou plus rarement de radioactivité, mais pas à un dénombrement des molécules d'ARN. Ainsi il n'est pas possible d'avoir une mesure absolue des molécules d'ARN, mais uniquement une mesure relative en référence à un échantillon particulier. L'annotation des sondes du microarray ovin n'était vraiment pas bonne, et nous avons utilisé différents outils d'annotation pour l'améliorer. Mais il faut être vigilent à la spécificité des transcrits. L'annotation de la puce pose un problème principalement pour les analyses de fonctions. Pour les analyses d'enrichissement, il faudrait utiliser comme référence l'ensemble des sondes de la puce, et calculer les scores d'enrichissement par rapport à cette référence. Cependant, comme la puce est souvent peu annotée, une part non négligeable des annotations a été réalisée à la main sur les sondes d'intérêt. L'utilisation de cette liste comme référence entraînerait donc un fort biais. Ainsi pour des analyses d'enrichissement nous avons utilisé comme référence des bases de données avec les gènes humains connus.

Un point fort de notre travail vient du fait que nous avons les profils d'expression génique de trois populations cellulaires des brebis des deux lignées. La méta-analyse de ces

données a permis d'incorporer un plus grand nombre d'observation à l'étude et ainsi d'augmenter la puissance des analyses. Actuellement deux approches ont été abordées pour analyser conjointement ces trois jeux de données. Cependant les aspects de cinétique semblent déterminants et ont été peu abordés jusqu'ici ; il serait intéressant de développer ou d'appliquer une approche dynamique qui prenne mieux en compte les cinétiques d'expression des gènes. Pour compléter ce travail, il serait utile d'incorporer d'autres jeux de données relatifs à la résistance aux mammites pour les comparer à ceux de notre étude. Les recommandations MIAME relatives à l'utilisation de microarray exigent la publication des données dans des bases publiques (GEO par exemple). Ainsi, nous espérons pouvoir accéder aux données bovines de Brand et al (2011). Pour valoriser l'ensemble de ces données dans une méta-analyse nous pourrions nous appuyer sur la collaboration que nous avons établie avec l'équipe d'Alessandra Stella (Parco Tecnologico Padano, Milan), pour mieux annoter les microarrays bovin et ovin à partir d'une même base de référence.

Toutefois, s'il fallait renouveler les expériences en 2012, les technologies de génotypage et de cartographie fine évoluant, avec des coûts plus raisonnables deux nouvelles stratégies d'étude s'ouvriraient à nous. La première consisterait à développer un microarray ovin avec un plus grand nombre de gènes (jusqu'à 60k sondes disponibles) pour mieux couvrir l'ensemble des transcrits du génome. Une fois que le microarray serait disponible, les protocoles de préparation d'échantillons, puis d'analyse seraient peu différents de ceux que nous avons appliqués jusqu'à présent. Toutefois, il faudrait réfléchir au protocole d'hybridation et envisager des marquages mono-couleur, qui semblent entraîner moins de biais techniques que les marquages avec deux fluorochromes. La deuxième stratégie serait de recourir au séquençage complet du transcriptome (RNAseq), une méthode prometteuse qui permet de générer des millions de données. Elle repose sur le séquençage de courtes séquences d'ARN, puis sur leur assemblage sur le génome étudié et enfin sur l'étude statistique des données. Le RNAseq a l'avantage de pouvoir prendre en compte l'ensemble des transcrits (des micro-ARN aux ARNm). Toutefois la mesure de certaines classes d'ARN (ARN polyA, micro-ARN, petits ARN non codants, …) recquiert des protocoles de préparation des librairies d'ARN différents. Ainsi seule une classe d'ARN peut être analysée en une fois. Selon les méthodologies d'analyse, il est possible de considérer les épissages alternatifs de transcrits. La partie technique du séquençage est maintenant opérationnelle, quoique plus coûteuse que les analyses à l'aide de microarrays. Mais, comme la génération de ces nouvelles données est très récente, les protocoles d'analyses bioinformatiques et biostatistiques pour la localisation des transcrits et les analyses statistiques restent à améliorer. Dans les premiers temps ces analyses utilisant le séquençage à haut débit vont demander un fort investissement en méthodologie. De plus, le génome ovin est actuellement en cours d'assemblage (Jiang et Dalrymple 2011) mais l'annotation n'est pas encore faite. Ainsi il existe un risque d'erreur de positionnement des transcrits sur le génome et donc un biais potentiel sur les analyses. Il existe aussi des biais liés à l'amplification des ADNc et des déséquilibres entre les extrémités 5' et 3'. Ainsi le séquençage de l'ARN est une technique prometteuse pour l'analyse du génome, mais encore coûteuse et qui demande énormément d'investissements méthodologiques.

La deuxième approche que nous avons développée se base sur des études du polymorphisme de l'ADN afin de compléter les analyses fonctionnelles dans les deux lignées divergentes et de confronter des gènes candidats fonctionnels avec des gènes candidats positionnels. Au terme de ce travail de thèse, nous avons pu également bénéficier des premiers résultats d'un protocole de détection de QTL basé sur des familles de grand-pères (n=1024 béliers d'IA) en race Lacaune (Rupp, Sallé, et al. 2011).

Dans les lignées divergentes, les analyses du polymorphisme de l'ADN ont permis d'identifier i) trois SNP sur OAR8 , dont deux associés aux lignées divergentes mais séparés par 1, 6Mpb et un autre associé à la formation des abcès situé à 2,0 Mpb et ii) une zone chromosomique située entre 95,49 et 96,70 Mpb sur OAR5 en association avec la présence d'abcès mammaires. Nous avons étudié la fréquence des génotypes dans la zone d'intérêt sur OAR5 et nous avons mis en évidence que les brebis saines sont principalement associées à des haplotypes homozygotes sur les quatre SNP étudiés, tandis que la fréquence des génotypes hétérozygotes est supérieure chez les brebis ayant des abcès. Quelques gènes différentiels dans les lignées sont co-localisés dans ces deux zones chromosomiques. Le gène *tpbg* est situé à 1,5 Mpb du SNP significatif sur OAR8. Ce gène code pour une glycoprotéine transmembranaire qui est impliquée dans l'adhésion cellulaire et il est plus exprimé chez les brebis de la lignée sensible. Le gène *cast* est situé à 94,05 Mpb sur OAR5, soit à 1,44 Mpb de la zone chromosomique identifiée. CAST est un inhibiteur de la calpaïne. Bien que leurs rôles dans le statut infectieux de la glande mammaire ou la formation des abcès ne soient pas établis et que leur étude mériterait d'être approfondie, ils constituent donc de bons candidats fonctionnels et positionnels.

Les analyses de polymorphisme sur 334 brebis ont produit peu de résultats, c'est-à-dire peu de zones bien identifiées (plusieurs SNP significatifs). Mais le fait d'avoir identifié des gènes différemment exprimés entre les lignées dans ces zones renforce l'intérêt qu'on peut leur porter. Ce petit nombre de résultats significatifs était attendu au vu du faible nombre d'observations pour des analyses d'association et du caractère polygénique des SCS. Il faut tout de même noter la présence de ces deux régions avec un degré de signification suffisant. En revanche la concordance des résultats entre les études de polymorphisme sur les lignées divergentes et les analyses de détection de QTL est faible. Les zones que nous avons identifiées pour les lignées divergentes et pour la formation des abcès ne sont pas significatives dans le dispositif QTL. On peut tout de même noter que le protocole QTL a mis en évidence un petit pic net à 115 Mpb sur OAR1 bien qu'il ne soit pas significatif (Rupp et al. 2011) et le SNP 2066 situé à la même localisation est significatif lors de l'analyse binaire des abcès.

Le positionnement sur le génome ovin des gènes différemment exprimés entre les brebis des deux lignées divergentes a mis en évidence principalement deux groupes de gènes : un sur le chromosome OAR3 avec huit gènes situés dans 1,3 Mpb et un sur OAR19 avec 7 gènes situés dans 3,6 Mpb, et dont tous les gènes sont plus exprimés chez les brebis de la lignée résistante. La co-expression de gènes co-localisés suggère la présence d'une régulation commune. Il est intéressant de noter i) que le gène candidat fonctionnel *tmem87b* est situé à proximité du groupe de gènes sur OAR3 (à 2,1 Mpb) ii) et que le gène codant pour le peptide antimicrobien SC5, plus exprimé chez les brebis de la lignée résistante est situé à l'intérieur du cluster de gènes sur OAR19. Cependant dans ces zones-là, aucun signal des analyses de polymorphisme n'est significatif. En revanche un QTL associé au SCS a été mis en évidence sur OAR3 (situé à 130 Mpb) (Rupp et al. 2011), celui-ci est au cœur du groupe de gènes

différentiels. De même, il existe un QTL situé sur OAR10 entre 50 Mpb (analyse LDLA) et 51 Mpb (analyse LA) (Rupp et al. 2011) situé au milieu d'un groupe de trois gènes identifiés dans la méta-analyse (entre 49,2 et 51,7Mpb). Cette cohérence entre les analyses QTL et les analyses transcriptomiques suggère qu'il existe dans ces régions une conformation chromatinienne qui influence l'expression de plusieurs gènes en relation avec la sensibilité/résistance aux IMI. Ces gènes différemment exprimés constituent donc par ailleurs de bons candidats. Il est possible que le polymorphisme en question ne soit pas situé sur une région codante, mais dans une zone régulatrice qui affecte plusieurs de ces gènes. Toutefois, l'intégration des dernières informations de QTL est très récente et elle doit être approfondie dans les prochains mois pour identifier tous les points de convergence entre les différentes analyses (transcriptome, cas contrôle, QTL).

Les gènes *tp53*, *ahr* et *sc5* candidats fonctionnels pour expliquer les différences entre les deux lignées de brebis sont situés sur OAR11, OAR4 et OAR19 respectivement. Dans nos analyses, aucun SNP significatif n'était situé sur aucun de ces trois chromosomes. En revanche dans les analyses de QTL, un QTL a été mis en évidence sur OAR11 entre 37 Mpb (dans l'analyse d'association) et 43 Mpb (dans l'analyse LDLA) (Rupp et al. 2011) et *tp53* est situé à 26,92 Mpb sur ce chromosome. Ainsi, les analyses de polymorphisme suggèrent que ces deux gènes ne sont pas à l'origine des différences entre les lignées, mais ils sont peut-être en aval d'un autre polymorphisme.

Dans le cas des lignées divergentes, la force du dispositif repose sur la connaissance précise d'un phénotype particulier, pour lequel les données en ferme ne sont pas enregistrées et pour lequel aucune analyse d'association n'a pu être réalisée jusqu'à présent. Ainsi, les résultats obtenus sur OAR5 et sa probable implication dans le développement des abcès sont nouveaux et prometteurs. Pour approfondir la compréhension de ce phénotype et d'autres phénotypes fins, il serait intéressant :

- d'intégrer plus de cas aux analyses, afin d'augmenter la puissance du dispositif ;
- de traiter de nouveaux phénotypes, tels que les données d'analyses bactériologiques du lait ; jusqu'à présent nous ne disposions pas d'un grand nombre d'analyses bactériologiques sur les 334 brebis génotypées, mais ces informations seront prochainement disponibles.

Depuis 2010, un projet européen (Sustainable Solutions for Small Ruminants, 3SR) a été mis en place pour découvrir des QTL associés aux mammites, au parasitisme, à la reproduction et à la tuberculose. Le déroulement du projet est similaire pour les deux premières thématiques avec une primo-détection de QTL (cette étape est bien avancée), suivie d'une cartographie fine de ces QTL afin de réduire les intervalles de confiance et de se rapprocher voire d'identifier les mutations causales. Enfin, ces informations de QTL doivent être utilisées pour identifier des animaux avec des capacités de résistance / sensibilité extrêmes pour réaliser des analyses transcriptomiques. Au vu de nos résultats, deux zones chromosomiques peuvent être privilégiées. Sur OAR5, 4 SNP sont associés à la formation des abcès et leurs fréquences génotypiques laissent penser qu'il existe un polymorphsime à

proximité qui explique au moins en partie, la présence d'abcès. Sur OAR8 le positionnement des SNP significatifs est trop épars pour que des informations fiables sur les allèles soient utilisées. Ainsi le choix des animaux à analyser en microarray pourrait reposer sur un groupe de brebis de la lignée résistante avec des allèles favorables (homozygotes sur les SNP d'intérêt du chromosome OAR5) vs un deuxième groupe de brebis de la lignée sensible avec des allèles défavorables (hétérozygotes sur ces mêmes SNP) pour augmenter la divergence des phénotypes observés après infection et aider à l'identification des mécanismes différemment régulés entre les brebis.

En résumé, nous avons montré que les fonctions de migration des cellules immunitaires et les processus inflammatoires ne se traduisent pas par des activations des mêmes voies chez les brebis de la lignée résistante et chez celles de la lignée sensible. Nous avons également identifié des gènes fonctionnels candidats (*ahr, tp53, sc5* et *tmem87b*) pour expliquer la différence de sensibilité aux mammites. En parallèle, les études du polymorphisme de l'ADN ont permis de mettre en évidence une zone chromosomique d'intérêt pour la formation des abcès mammaires sur le chromosome OAR5. Ainsi ce travail de thèse nous a permis d'identifier des mécanismes cellulaires de réponse à *Staphylococcus* dans des groupes d'animaux avec des sensibilités aux mammites différentes et de proposer des gènes candidats fonctionnels et positionnels, dont l'étude mériterait d'être approfondie. Ce travail illustre les nouvelles possibilités d'investigation sur les mécanismes conduisant à la variabilité de réponses anti-infectieuses dans une espèce de mammifères, pour une meilleure efficacité future des mesures de lutte et de contrôle.

ANNEXES

Annexe 1 : **Poster WCGALP, 2010**

Differential Transcriptional Response To Staphylococcus aureus Infection In Two Divergent Lines Of Sheep Selected On Milk Somatic Cell Score

C. Bonnefont, G. Foucras, M. Toufeer, C. Caubet, M.R. Aurel, C. Robert-Granié, P. Cunha, F. Gilbert, P. Rainard, R. Rupp

WCGALP 2010, Liepzig, ID 449

ID 449 PP4-143

Differential Transcriptional Response To *Staphylococcus aureus* Infection In Two Divergent Lines Of Sheep Selected On Milk Somatic Cell Score

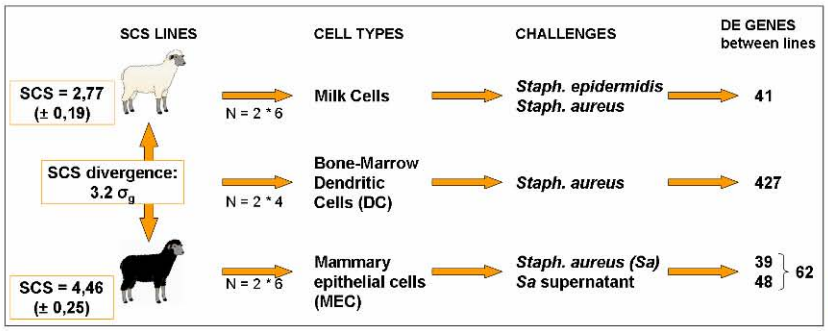
C. Bonnefont*†, M. Toufeer†, E. Foulon†, C. Caubet†, C. Tasca†, M.R. Aurel#, C. Robert-Granié*, P. Cunha§, F. Gilbert§, P. Rainard§, G. Foucras†, R. Rupp*

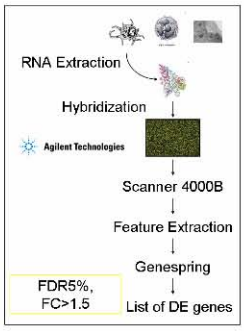
* INRA, UR631, Station d'Amélioration Génétique des Animaux, F-31326 Castanet-Tolosan, France
† INRA-ENVT, UMR1225, Interactions Hôtes Agents Pathogènes, F-31300 Toulouse, France
# INRA, UE321, Domaine expérimental de la Fage, F-12250, Roquefort, France
§ INRA, UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France

This project was supported by EADGENE, ANR and APIS-GENE.

INTRODUCTION & MATERIALS and METHODS

The milk somatic cell score (SCS) is an indirect indicator of mastitis, currently used as selection criterion of dairy ruminants to decrease intra-mammary infection prevalence. A divergent selection of sheep lines based on SCS was generated to create resistant and susceptible lines (Rupp *et al.* 2009). In this study, gene expression profiling of 3 cell types of resistant and susceptible ewes after *Staphylococcus* challenges was done. The differentially-expressed (DE) gene lists from the 3 experiments were pooled together and interpreted to provide enhanced insights into the genetic mechanisms involved in SCS-based selection.





RESULTS

Biological interpretation of the 516 DE probes between resistant and susceptible lines were done with Ingenuity Pathways Analysis (IPA, tables 1 and 2 and figure 1) and with Database for Annotation,Vizualisation and Integrated Discovery (DAVID, Table 3).

Table 1: Top canonical pathways s (IPA)

Name	p-value	Ratio
Acute Phase Response Signaling	2.95E-04	13/178
Leukocyte Extravasation Signaling	7.42E-04	13/194

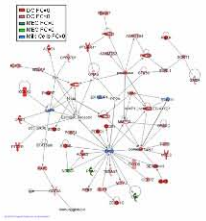


Figure 1: Merging of the top networks 2 and 3 (IPA Table 2)

Table 3: GO Term Biological Process (DAVID)

GO Term	p-value	Molecules
Response to wounding	7.02E-07	34
Response to organic substance	2.29E-06	40
Immune response	3.04E-05	36
Extracellular matrix organization	4.43E-05	12
Inflammatory response	4.69E-05	22
Collagen metabolic process	4.74E-05	7
Innate immune response	1.38E-04	13
Oxidation reduction	1.98E-04	32
Multicellular organismal metabolic process	2.43E-04	7
Membrane organization	4.26E-04	22
Regulation of cell adhesion	5.16E-04	12

Table 2: Top network (IPA)

Associated Network Functions	Score	Molecules
1 Cellular Compromise, Cellular Function and Maintenance, Small Molecule Biochemistry	43	29
2 Genetic disorder, Connective Tissue Disorders, Cellular Assembly and Organization	39	28
3 Genetic disorder, Connective Tissue Disorders, Dermatological Diseases and Conditions	36	26

CONCLUSION

Transcriptomic results of the 3 cell-types showed that the differentially-expressed genes between resistant and susceptible lines are mainly associated with immune response like inflammatory response (*il18bp, serpine1, il12b, tnf, myd88, ltf, cd109, furin, tlr3, mmp1, mmp9, il12rb1, cxcr1, il1r1*) and leukocyte extravasation (*f11r, cybb, cldn4, -5, actn4, ncf1, mmp1, -9, -12, -13, vav1, rhoh*). Furthermore, a high number of DE genes (more than 50) have previously been associated with genetic disorders. These results highlight key mechanisms and genes that underlie genetic basis of resistance and susceptibility to mastitis.

Rupp *et al* (2009) J. Dairy Sci. **92**: 1203-1219

9th WCGALP - 2010

ALIMENTATION AGRICULTURE ENVIRONNEMENT

Annexe 2 : poster EEAP 2011

A case control study on genome wide SNP-based association mapping of mammary abscesses in Lacaune sheep using the Illumina ovine SNP50 BeadChip

C.M.D. Bonnefont, G. Foucras, G. Sallé, S. Teyssèdre, C. Allain, MR. Aurel, D. Bergonier, C. Moreno-Romieux, R. Rupp

EAAP Stavanger, Norway, August 2011.

10815 - session 30

A case control study on genome wide SNP-based association mapping of mastitis in Lacaune sheep using the Illumina ovine SNP50 BeadChip

C.M.D. Bonnefont[1,2], G. Foucras[2] , G. Sallé[1,2], S. Teyssèdre[1], C. Allain[1], MR. Aurel[3], D. Bergonier[2], C.R. Moreno[1], R. Rupp[1]

[1]INRA UR631, F-31326 Castanet-Tolosan [2]INRA-ENVT UMR1225, F-31076 Toulouse [3]INRA UE321, F-12250 Roquefort
rachel.rupp@toulouse.inra.fr

Introduction

- Mastitis is an inflammation of the udder, mainly due to intra-mammary infections with bacteria.
- Abscesses develop in the udder parenchyma as a consequence of chronic form of mastitis due to *Staphylococci*.
- Detection of mammary abscesses has been routinely performed by trained technicians in the INRA facility of La Fage in two lines of Lacaune sheep selected for high and low milk somatic cell counts.
- High SCC line ewes exhibited significantly more mammary abscesses than their low SCC line counterparts (36% and 9% of affected lactations, respectively). Mammary abscesses were therefore closely associated to the susceptibility phenotype.

Material and Methods

ANIMALS
2 lines of dairy Lacaune sheep divergently selected on milk somatic cell counts



TRAIT = **Abscesses** observed after udder examination of ewes in first lactation by trained technicians

Abscess - binary: 0: none during L1 (N=117)
1: abscesses detected at ≥2 examinations (N=20)
Abscess - categorical: 0 : none during L1 (N=117)
1, 2, 3, 4, 5 or more: number of abscesses (N=9, 10, 7, 5, 10, respectively)

MARKERS = Illumina ovine SNP50 BeadChip

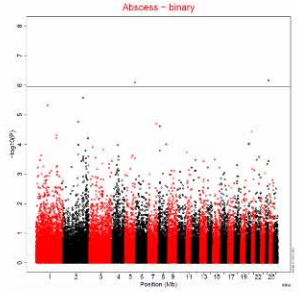
43 445 SNP



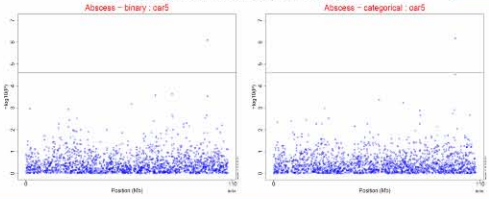
STATISTICAL ANALYSIS
- **mixed model** including SNP effect + random **polygenic** effect
- 4 generations traced back in pedigree (1255-1321 animals)
- SNP by SNP analyses using ASREML
- Significance threshold corrected for multiple testing : 5% Bonferroni chromosome and genome levels

Results

Two SNP above the 5% genome-wide Bonferroni threshold on OAR5 and OAR 24



Most consistent results between traits in a narrow region of OAR5



For the most significant SNP on OAR5, the mutation G>A is much more frequent in cases whereas controls are almost all homozygous

Significant SNP	AA	AG	GG
Cases	5%	30%	65%
Controls	0%	3%	97%

Conclusion

- A very narrow region of OAR5 was significantly associated with mammary abscesses
- Potential influence of other regions (on OAR2, OAR24) was also suggested.

This project was supported by ANR and APIS-GENE (Genanimal "SheepSNPQTL")

62nd annual Meeting EAAP 2011
August 29th – September 2nd
Stavanger, Norway

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

Annexe 3 : Répartition des SNP sur chaque chromosome et espacement moyen

chromosomes	Longueur en pbases	Nb SNP par OAR	% SNP	% cumulée SNP	Espacement moyen
OAR1	298898288	4855	11.18%	11.18%	61552
OAR2	262337699	4681	10.77%	21.95%	56031
OAR3	241973826	4165	9.59%	31.54%	58083
OAR4	127756642	2242	5.16%	36.70%	56958
OAR5	116774033	1995	4.59%	41.29%	58504
OAR6	128650554	2151	4.95%	46.24%	59782
OAR7	108577321	1871	4.31%	50.55%	58001
OAR8	97654697	1734	3.99%	54.54%	56285
OAR9	100529478	1763	4.06%	58.60%	56990
OAR10	93881270	1518	3.49%	62.09%	61805
OAR11	66999053	991	2.28%	64.37%	67539
OAR12	86143437	1465	3.37%	67.74%	58761
OAR13	88778168	1396	3.21%	70.96%	63549
OAR14	69090240	948	2.18%	73.14%	72803
OAR15	89805602	1396	3.21%	76.35%	64285
OAR16	76934129	1300	2.99%	79.34%	59135
OAR17	78361747	1145	2.64%	81.98%	68378
OAR18	72232728	1149	2.64%	84.62%	62811
OAR19	64768073	1038	2.39%	87.01%	62337
OAR20	55693855	920	2.12%	89.13%	60471
OAR21	55321330	712	1.64%	90.77%	77590
OAR22	55697004	931	2.14%	92.91%	59761
OAR23	66579132	909	2.09%	95.01%	73164
OAR24	45127810	605	1.39%	96.40%	74468
OAR25	48197168	813	1.87%	98.27%	59210
OAR26	49927886	752	1.73%	100.00%	66305

Annexe 4 : Liste des communications

- Publications scientifiques :

A. Bonnefont, C., Toufeer, M., Caubet, C., Foulon, E., Tasca, C., Aurel, MR., Bergonier, D., Boullier, S., Robert-Granié, C., Foucras G., Rupp, R., 2011, Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus, **BMC Genomics,** 12:208

A. Toufeer M., Bonnefont, C., Foulon, E., Caubet C., Tasca C., Aurel M. R., Robert-Granié C., Rupp R., Foucras G., 2011. Gene expression profiling of BM-derived dendritic cells reveals important mechanisms associated with predisposition to *Staphylococcus* infections, **Plos One**, vol 6, Issue 8, e22147

A. Bonnefont C., Rainard, P., Cunha, P., Gilbert, F., Toufeer, M., Aurel, MR., Rupp, R., Foucras, G., 2011. Genetic susceptibility to *Staphylococcus aureus* mastitis in sheep: transcriptional profiling of mammary epithelial cells in response to living cells or culture supernatant, **Physiological Genomics**, en cours de correction

- Communications orales dans des congrés internationaux :

B. Bonnefont, C., Rupp R., Caubet C., Toufeer M., Robert-Granié C., Foucras G., 2009. Response to mammary infection in two divergent lines of ewes selected on milk somatic cell counts : transcriptomic analyses of milk cells upon challenge. 60th Annual Meeting EAAP, Barcelone, Espagne, 24-27 Aout 2009, Session 45, Theatre 10, Abstract, p.507.

B. Rupp, R., Bonnefont C., Robert-Granié C., Foucras G., 2009. Gene expression profiling in divergent lines of sheep for enhanced insight into genetic resistance to mastitis. EADGENE days : Genomics for Animal Health : Outlook for the Future, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France, 12-15 Octobre 2009, Abstract, 1 page.

B. Bonnefont, C., Rainard P., Gilbert F., Cunha P., Aurel M. R., Caubet C., Toufeer M., Robert-Granié C., Rupp R., Foucras G., 2010. Transcriptional response to Staphylococcus aureus challenge in mammary epithlial cells isolated from two divergent lines of ewes selected on milk somatic cell score. Animal Genomics for Animal Health International Symposium, Paris, France, 31 Mai - 2 Juin 2010, Abstract, 1 p.

B. Rupp, R., Bonnefont C., Bergonier D., Aurel M. R., Martin P., Jacquiet P., Moreno C., Robert-Granié C., Rainard P., Foucras G., 2010. An integrated genomic approach towards analysis of resistance to mastitis in ruminants. 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig, Allemagne, 1-6 Aout 2010, ID 759, 4 pages

- Communications orales dans des congrés nationaux :

C. Toufeer, M., Foulon E., Bonnefont C., Caubet C., Tasca C., Rupp R., Foucras G., 2010. Dendritic cell gene expression profiling reveals difference of activation kinetics between out bred animal with opposite susceptibility to staphylococcus spp infections. 7ème Rencontre du Réseau Français "Immunologie des Animaux Domestiques" ENVA Maisons-Alfort (Paris), 17-18 Mai 2010, Abstract 1page.

C. Bonnefont, C., Foucras G., Toufeer M., Caubet C., Aurel M. R., Robert-Granié C., Cunha P., Gilbert F., Rainard P., Rupp R., 2011. Analyses transcriptomiques de la réponse des cellules de la glande mammaire à Staphylococcus Aureus dans deux lignées divergentes

de brebis sélectionnées sur la numération cellulaire du lait. 8ème Rencontres du Réseau Immunologie des Animaux Domestiques, Lyon, France, 5-6 Mai 2011, Présentation Orale, Abstract, 1 page.

C. Bonnefont, C., Foucras G., Toufeer M., Caubet C., Tasca C., Aurel M. R., Robert-Granié C., Cunha P., Gilbert F., Rainard P., Rupp R., 2011. Méta-analyse des analyses transcriptomiques de la réponse à Staphylococcus Aureus de deux lignées divergentes de brebis sélectionnées sur la résistance aux infections mammaires. 10ème Edition des Journées d'Animation Scientifique du Département de Santé Animale, Fréjus, France, 22-25 Mai 2011, Présentation Orale, Abstract, 1 page.

- Posters dans des congrés internationaux :

D. Bonnefont, C., Foucras G., Toufeer M., Caubet C., Aurel M. R., Robert-Granié C., Cunha P., Gilbert F., Rainard P., Rupp R., 2010. Differential transcriptional response to Staphylococcus aureus infection in two divergent lines of sheep selected on milk somatic cell score. 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig, Allemagne, 1-6 Aout 2010, Poster, PP4 - 143, 4 pages.

D. Bonnefont, C., Foucras G., Sallé G., Teyssèdre S., Allain C., Aurel M. R., Bergonier D., Moreno-Romieux C., Rupp R., 2011. A case control study on genome wide SNP-based association mapping of mammary abscesses in Lacaune sheep using the Illumina ovine SNP50 BeadChip. 62nd Annual Meeting EAAP, Stavanger, Norvège, 29 Aout - 1er Septembre 2011, Poster, Abstract 1 page.

BIBLIOGRAPHIE

Aderem, A, et RJ Ulevitch. 2000. « Toll-like receptors in the induction of the innate immune response ». *Nature* 406 (6797): 782-787.

Agerberth, B, J Charo, J Werr, B Olsson, F Idali, L Lindbom, R Kiessling, H Jörnvall, H Wigzell, et G H Gudmundsson. 2000. « The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations ». *Blood* 96 (9) : 3086-3093.

Ali, AKA, et GE Shook. 1980. « An Optimum Transformation for Somatic Cell Concentration in Milk ». *J. Dairy Sci*63 (3): 487-490.

Allain, C, MR Aurel, F Pailler, D Portes, JM Menras, O Duvallon, B Pena-Arnaud, et al. 2010. La cinétique d'émission du lait et l'anatomie de la mamelle sont associées à la résistance aux mammites : résultats d'une sélection divergente de brebis sur les comptages de cellules somatiques. Dans *Rencontre Recherche Ruminants*. Paris.

Alluwaimi, AM, CM Leutenegger, TB Farver, PV Rossitto, WL Smith, et JS Cullor. 2003. « The cytokine markers in Staphylococcus aureus mastitis of bovine mammary gland ». *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 50 (3): 105-111.

Van Amersfoort, ES, Theo JC Van Berkel, et J Kuiper. 2003. « Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock ». *Clin. Microbiol. Rev.* 16 (3): 379-414.

Amorena, B, R Baselga, et I Albizu. 1994. « Use of liposome-immuno potentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine ». *Vaccine* 12 (3): 243-249.

Andersson, L, et M Georges. 2004. « Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits ». *Nature Reviews. Genetics* 5 (3) : 202-212.

Arbibe, L, JP Mira, N Teusch, L Kline, M Guha, N Mackman, P J Godowski, R J Ulevitch, et U G Knaus. 2000. « Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway ». *Nature Immunology* 1 (6): 533-540.

Ariznabarreta, A, C Gonzalo, et F San Primitivo. 2002. « Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to staphylococci ». *J Dairy Sci* 85 (6): 1370-1375.

Aungier, SP, et FH Austin. 1987. « A study of the efficacy of intramammary antibiotics in the treatment of clinical mastitis ». *The British Veterinary Journal* 143 (1): 88-90.

Axford, RFE, SC Bishop, FW Nicholas, et JB Owen. 2000. *Breeding for disease resistance in farm animals*. CABI publishing.

Baccini, A, P Besse, PG.P Martin, C Robert-Granié, et M San-Cristobal. 2005. « Stratégies pour l'analyse statistique de données transcriptomiques ». *Journal de la société française de statistique* 146 (1-2): 5-44.

Bainton, DF, JL Ullyot, et MG Farquhar. 1971. « The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow ». *The Journal of Experimental Medicine* 134 (4): 907-934.

Ball, CA, G Sherlock, HParkinson, P Rocca-Sera, C Brooksbank, HC Causton, D Cavalieri, et al. 2002. « Standards for microarray data ». *Science (New York, N.Y.)* 298 (5593): 539.

Banchereau, J, F Briere, C Caux, J Davoust, S Lebecque, Y J Liu, B Pulendran, et K Palucka. 2000. « Immunobiology of dendritic cells ». *Annual Review of Immunology* 18: 767-811.

Bannerman, DD 2009. « Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows ». *J Anim Sci* 87: 10 - 25.

Bannerman, DD, MJ Paape, JP Goff, K Kimura, JD Lippolis, et JC Hope. 2004. « Innate immune response to intramammary infection with Serratia marcescens and Streptococcus uberis ». *Vet Res* 35: 681 - 700.

Bannerman, DD, MJ Paape, JW Lee, X Zhao, JC Hope, et P Rainard. 2004. « Escherichia coli and Staphylococcus aureus elicit differential innate immune responses following intramammary infection ». *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11 (3): 463-472.

Bansal, BK, J Hamann, NT Grabowskit, et KB Singh. 2005. « Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis ». *The Journal of Dairy Research* 72 (2): 144-152.

Baranova, IN, R Kurlander, AV Bocharov, TG Vishnyakova, Z Chen, AT Remaley, G Csako, AP Patterson, et TL Eggerman. 2008. « Role of human CD36 in bacterial recognition, phagocytosis, and pathogen-induced JNK-mediated signaling ». *J Immunol* 181: 7147-7156.

Barber, MR, AG Pantschenko, LS Hinckley, et TJ Yang. 1999. « Inducible and constitutive in vitro neutrophil chemokine expression by mammary epithelial and myoepithelial cells ». *Clin Diagn Lab Immunol* 6 (6): 791-798.

Barillet, F, JM Astruc, et G Lagriffoul. 2007. Taking into account functional traits in dairy sheep breeding programs through the French example. 57-64. Netherlands.

Barkema, HW, MJ Green, AJ Bradley, et RN Zadoks. 2009. « Invited review: The role of contagious disease in udder health ». *J. Dairy Sci*92 (10): 4717-4729.

Barkema, HW, YH Schukken, TJ Lam, ML Beiboer, G Benedictus, et A Brand. 1998. « Management practices associated with low, medium, and high somatic cell counts in bulk milk ». *J. Dairy Sci*81 (7): 1917-1927.

Barkema, HW, YH Schukken, et RN Zadoks. 2006. « The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine Staphylococcus aureus Mastitis ». *J. Dairy Sci*89 (6): 1877-1895.

Bar-Or, C, H Czosnek, et H Koltai. 2007. « Cross-species microarray hybridizations: a developing tool for studying species diversity ». *Trends in Genetics* 23 (4): 200-207.

Barrett, JC, et ES Kawasaki. 2003. « Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression ». *Drug Discovery Today* 8 (3): 134-141.

Bartlett, PC, GY Miller, SE Lance, et LE Heider. 1992. « Environmental and managerial determinants of somatic cell counts and clinical mastitis incidence in Ohio dairy herds ». *Preventive Veterinary Medicine* 14 (3-4): 195-207.

Bayles, KW, CA Wesson, LE Liou, LK Fox, GA Bohach, et WR Trumble. 1998. « Intracellular Staphylococcus aureus escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells ». *Infect. Immun.* 66 (1): 336-342.

Benjamini, Y, et Y Hochberg. 1995. « Controlling the false discovery rate - A practical and powerful approach to multiple testing ». *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* 57 (1): 289-300.

Bergonier, D, MC Blanc, B Fleury, G Lagriffoul, F Barillet, et X Berthelot. 1997. Les mammites des ovins et des caprins laitiers : étiologie, épidémiologie, contrôle présenté à 4e Rencontres Recherche Ruminants, Paris.

Bergonier, D, R de Crémoux, R Rupp, G Lagriffoul, et X Berthelot. 2003. « Mastitis of dairy small ruminants ». *Vet. Res.* 34 (5): 689-716.

Bergonier, D, G Lagriffoul, X Berthelot, et F Barillet. 1994. Facteurs de variation non infectieux des comptages de cellules somatiques chez les ovins et les caprins laitiers présenté à Proc Int Somatic Cells and Milk of Small Ruminants, Bella, Italy.

Beutler, B. 2004. « Innate immunity: an overview ». *Molecular Immunology* 40 (12): 845-859.

Bloemhof, S, G de Jong, et Y de Haas. 2009. « Genetic parameters for clinical mastitis in the first three lactations of Dutch Holstein cattle ». *Veterinary Microbiology* 134 (1-2): 165-171.

Bohannon, J, W Cui, E Sherwood, et T Toliver-Kinsky. 2010. « Dendritic Cell Modification of Neutrophil Responses to Infection after Burn Injury ». *The Journal of Immunology* 185 (5): 2847 -2853.

Bohnenkamp, HR, KT Papazisis, JM Burchell, et J Taylor-Papadimitriou. 2007. « Synergism of Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by monocyte-derived dendritic cells is mediated through p38 MAPK and lowers the threshold of T-helper cell type I responses ». *Cellular Immunology* 247 (2): 72-84.

Boichard, D, et R Rupp. 1997. Genetic analysis and genetic evaluation for somatic cell score in French dairy cattle. 54-60. Uppsala, Sweden.

Boldrick, JC, AA Alizadeh, M Diehn, S Dudoit, C Long Liu, CE Belcher, D Botstein, LM Staudt, PO Brown, et DA Relman. 2002. « Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2): 972-977.

Bonaiti, B, S Moureaux, et S Mattalia. 2005. Bilan et paramètres génétiques des mammites cliniques collectées par le contrôle laitier dans les races Montbéliarde, Normande et Prim'Holstein. Dans *Renc. Rech. Ruminants*, 12:271-274. Paris, France.

Bonnefont, CMD, P Rainard, P Cunha, FB Gilbert, M Toufeer, MR Aurel, R Rupp, et G Foucras. submitted. « Genetic susceptibility to Staphylococcus aureus mastitis in sheep: transcriptional profiling of mammary epithelial cells in response to living cells or culture supernatant ». *Physiological Genomics*

Bonnefont, C G Foucras, M Toufeer, C Caubet, MR Aurel, C Robert-Granié, P Cunha, FB Gilbert, P Rainard, et R Rupp. 2010. Differential Transcriptional Response To Staphylococcus aureus Infection In Two Divergent Lines Of Sheep Selected On Milk Somatic Cell Score. WCGALP, Leipsig, Germany.

Bonnefont, C, M Toufeer, C Caubet, E Foulon, C Tasca, MR Aurel, D Bergonier, et al. 2011. « Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus ». *BMC Genomics* 12 (1): 208.

Borregaard, N. 2010. « Neutrophils, from marrow to microbes ». *Immunity* 33 (5): 657-670.

Bossers, K, B Ylstra, RH Brakenhoff, SJ Smeets, J Verhaagen, et MA van de Wiel. 2010. « Intensity-based analysis of dual-color gene expression data as an alternative to ratio-based analysis to enhance reproducibility ». *BMC Genomics* 11.

Bottero, V, V Imbert, C Frelin, JL Formento, et JF Peyron. 2003. « Monitoring NF-kappa B transactivation potential via real-time PCR quantification of I kappa B-alpha gene expression ». *Molecular Diagnosis: A Journal Devoted to the Understanding of Human Disease Through the Clinical Application of Molecular Biology* 7 (3-4): 187-194.

Boudjellab, N, HS Chan-Tang, et X Zhao. 2000. « Bovine interleukin-1 expression by cultured mammary epithelial cells (MAC-T) and its involvement in the release of MAC-T derived interleukin-8 ». *Comp. Physiol. Biochem.* 127 (2): 191-199.

Bougarn, S, P Cunha, FB Gilbert, F Meurens, et P Rainard. 2011. « Technical note: Validation of candidate reference genes for normalization of quantitative PCR in bovine mammary epithelial cells responding to inflammatory stimuli ». *J Dairy Sci* 94 (5): 2425-2430.

Bougarn, S, P Cunha, A Harmache, A Fromageau, FB Gilbert, et P Rainard. 2010. « Muramyl dipeptide synergizes with Staphylococcus aureus lipoteichoic acid to recruit neutrophils in the mammary gland and to stimulate mammary epithelial cells ». *Clinical and Vaccine Immunology* 17 (11): 1797-1809.

Brand, B, A Hartmann, D Repsilber, B Griesbeck-Zilch, O Wellnitz, C Kuhn, S Ponsuksili, HHd Meyer, et M Schwerin. 2011. « Comparative expression profiling of E. coli and S. aureus inoculated primary mammary gland cells sampled from cows with different genetic predispositions for somatic cell score ». *Genetics, Selection, Evolution: GSE* 43 (1): 24.

Brazma, A, P Hingamp, J Quackenbush, G Sherlock, P Spellman, C Stoeckert, J Aach, et al. 2001. « Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data ». *Nat Genet.* 29 (4): 365-371.

Brazma, A. 2009. « Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME)--successes, failures, challenges ». *TheScientificWorldJournal* 9: 420-423.

Brinkmann, V, U Reichard, C Goosmann, B Fauler, Y Uhlemann, DS Weiss, Y Weinrauch, et A Zychlinsky. 2004. « Neutrophil extracellular traps kill bacteria ». *Science (New York, N.Y.)* 303 (5663): 1532-1535.

Brogden, KA, M Ackermann, PB McCray Jr, et BF Tack. 2003. « Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 22 (5): 465-478.

Burton, JL, et RJ Erskine. 2003. « Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease ». *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 19 (1): 1-45.

Burvenich, C, MJ Paape, AW Hill, AJ Guidry, RH Miller, R Heyneman, WD Kremer, et A Brand. 1994. « Role of the neutrophil leucocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced E. coli mastitis in cows immediately after calving ». *The Veterinary Quarterly* 16 (1): 45-50.

Calvinho, LF, RA Almeida, et SP Oliver. 2001. « Influence of bacterial factors on proliferation of bovine mammary epithelial cells ». *Revista Argentina De Microbiología* 33 (1): 28-35.

Calzolari, A, JA Giraudo, H Rampone, L Odierno, AT Giraudo, C Frigerio, S Bettera, et al. 1997. « Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 2. Evaluation in two commercial dairy herds ». *J. Dairy Sci*80 (5): 854-858.

Capuco, AV, SA Bright, JW Pankey, DL Wood, RH Miller, et J Bitman. 1992. « Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin ». *J. Dairy Sci*75 (8): 2126-2130.

Carlén, E, E Strandberg, et A Roth. 2004. « Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score, and production in the first three lactations of Swedish holstein cows ». *J. Dairy Sci*87 (9): 3062-3070.

Carlson, GP, et JJ Kaneko. 1973. « Isolation of leukocytes from bovine peripheral blood ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 142 (3): 853-856.

Casel, P, F Moreews, S Lagarrigue, et C Klopp. 2009. « sigReannot: an oligo-set re-annotation pipeline based on similarities with the Ensembl transcripts and Unigene clusters ». *BMC Proc* 3 (Suppl 4): S3.

Castellano, G, AM Woltman, N Schlagwein, W Xu, FP Schena, MR Daha, et C van Kooten. 2007. « Immune modulation of human dendritic cells by complement ». *European Journal of Immunology* 37 (10): 2803-2811

Chang, JS, GC Russell, O Jann, EJ Glass, D Werling, et DM Haig. 2009. « Molecular cloning and characterization of Toll-like receptors 1-10 in sheep ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 127 (1-2): 94-105.

Charmoy, M, S Brunner-Agten, D Aebischer, F Auderset, P Launois, G Milon, AEI Proudfoot, et F Tacchini-Cottier. 2010. « Neutrophil-Derived CCL3 Is Essential for the Rapid Recruitment of Dendritic Cells to the Site of Leishmania major Inoculation in Resistant Mice ». *PLoS Pathog* 6 (2): e1000755.

Cherfils-Vicini, J, B Vingert, AVarin, E Tartour, WH Fridman, C Sautès-Fridman, CH Régnier, et I Cremer. 2008. « Characterization of immune functions in TRAF4-deficient mice ». *Immunology* 124 (4): 562-574.

Cheung, VG, M Morley, F Aguilar, A Massimi, R Kucherlapati, et G Childs. 1999. « Making and reading microarrays ». *Nature Genetics* 21 (1 Suppl): 15-19.

Clark, R , et HR Kimball. 1971. « Defective granulocyte chemotaxis in the Chediak-Higashi syndrome ». *The Journal of Clinical Investigation* 50 (12): 2645-2652.

Clark, RT, A Hope, M Lopez-Fraga, N Schiller, et DD Lo. 2009. « Bacterial particle endocytosis by epithelial cells is selective and enhanced by tumor necrosis factor receptor ligands ». *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 16 (3): 397-407.

de Clermont, R. 1992. Les cellules dans le lait de chèvre présenté à Institut de l'élevage, 68pp, Paris.

Craven, N, et MR Williams. 1985. « Defences of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 10 (1): 71-127.

de Crémoux, R, B Poutrel, F Berny, et V Heuchel. 1994. Les numérations cellulaires chez la chèvre: un outil de diagnostic présomptif des infections mammaires. Dans journées 3R, Paris, France.

de Crémoux, R, B Poutrel, R pillet, G Perrin, M. Ducelliez, et V Heuchel. 1996. Utilisation des numérations cellulaires pour le diagnostic des infections mammaires d'origine bactérienne chez la chèvre. présenté à In:ProceedingsoftheSymposiumonsomaticcellsandmilkofsmallruminants, Bella, Italy 77 pp35-39.

Van Damme, J, A Wuyts, G Froyen, E Van Coillie, S Struyf, A Billiau, P Proost, JM Wang, et G Opdenakker. 1997. « Granulocyte chemotactic protein-2 and related CXC chemokines: from gene regulation to receptor usage ». *J. Leukoc. Biol.* 62 (5): 563 - 569.

Davies, G, S Genini, SC Bishop, et E Giuffra. 2009. « An Assessment of Opportunities to Dissect Host Genetic Variation in Resistance to Infectious Diseases in Livestock ». *animal* 3 (03): 415-436.

Detilleux, JC. 2002. « Genetic factors affecting susceptibility of dairy cows to udder pathogens ». *Vet Immunol Immunop* 88 (3-4): 103-10.

Detilleux, JC, KJ Koehler, AE Freeman, ME. Kehrli, et DH Kelley. 1994. « Immunological parameters of periparturient Holstein cattle: genetic variation ». *J Dairy Sci* 77 (9): 2640-50.

Diez-Fraile, A, E Meyer, L Duchateau, et C Burvenich. 2004. « Effect of proinflammatory mediators and glucocorticoids on L-selectin expression in peripheral blood neutrophils from dairy cows in various stages of lactation ». *American Journal of Veterinary Research* 65 (10): 1421-1426.

Doyle, SL, et LAJ O'Neill. 2006. « Toll-like receptors: From the discovery of NF[kappa]B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity ». *Biochemical Pharmacology* 72 (9): 1102-1113. doi:16/j.bcp.2006.07.010.

Duyao, MP, DJ Kessler, DB Spicer, et GE Sonenshein. 1992. « Transactivation of the murine c-myc gene by HTLV-1 tax is mediated by NFkB ». *AIDS Research and Human Retroviruses* 8 (5): 752-754.

Elkouby-Naor, L, et T Ben-Yosef. 2010. Functions of Claudin Tight Junction Proteins and Their Complex Interactions in Various Physiological Systems. Vol 279:1-32. Academic Press.

el-Saied, UM, JA Carriedo, LF de la Fuente, et F San Primitivo. 1999. « Genetic parameters of lactation cell counts and milk and protein yields in dairy ewes ». *J. Dairy Sci*82 (3): 639-644.

Emanuelson, U, B Danell, et J Philipsson. 1988. « Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell counts, and milk production estimated by multiple-trait restricted maximum likelihood ». *J. Dairy Sci*71 (2): 467-476.

Fabre, JM, H Morvan, B Lebreux, P Houffschmitt, et X Berthelot. 1997. Estimation de la fréquence des différents germes responsables de mammites en France - Partie 1: mammites cliniques. 17-23.

Faye, B, N Dorr, F Lescourret, J Barnouin, et M Chassagne. 1994. « Les infections intra-mammaires chez la vache laitière dans l'enquête écopathologique Bretagne ». *INRA Prod. Anim.*, sect. 7.

Fernando, RS, RB Rindsig et SL Spahr., 1982. Electrical conductivity of milk for detection of mastitis. J. Dairy Sci. 65, 659–664.

Foulon, E, et G Foucras. 2008. « Two populations of ovine bone marrow-derived dendritic cells can be generated with recombinant GM-CSF and separated on CD11b expression ». *Journal of Immunological Methods* 339 (1): 1-10.

Fritz, S, F Guillaume, T Druet, J Tarres, A Baur, M Boussaha, MY Boscher, et al. 2008. « Use of qtl fine mapping results for marker-assisted selection in dairy cattle ». *Proceeding of the 15èmes Rencontres Rcherche Ruminants*, 15 édition, sect. 15.

Froy, O. 2005. « Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signalling pathways ». *Cellular Microbiology* 7 (10): 1387-1397.

de la Fuente, R, RM Díez, G Domínguez-Bernal, JA Orden, et S Martínez-Pulgarín. 2010. « Restoring catalase activity in Staphylococcus aureus subsp. anaerobius leads to loss of pathogenicity for lambs ». *Vet. Res.* 41 (4).

Fujiwara, N, et K Kobayashi. 2005. « Macrophages in inflammation ». *Current Drug Targets. Inflammation and Allergy* 4 (3): 281-286.

Ganz, T. 2003. « Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity ». *Nature Reviews. Immunology* 3 (9): 710-720..

Geissmann, F, MG Manz, S Jung, MH Sieweke, M Merad, et K Ley. 2010. « Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells ». *Science (New York, N.Y.)* 327 (5966) : 656-661.

Genini, S, B Badaoui, G Sclep, SC Bishop, D Waddington, MH Pinard van der Laan, C Klopp, et al. 2011. « Strengthening insights into host responses to mastitis infection in ruminants by combining heterogeneous microarray data sources ». *BMC Genomics* 12 (1): 225.

Gilbert, FB, B Poutrel, et L Sutra. 1994. « Immunogenicity in cows of Staphylococcus aureus type 5 capsular polysaccharide-ovalbumin conjugate ». *Vaccine* 12 (4): 369-374.

Gilmour, AR, BJ Gogel, BR Cullis, et R Thompson. 2006. « Asreml user guide release 2.0. » *VSN International Ltd*, sect. 320.

Gilot, P, G Lina, T Cochard, et B Poutrel. 2002. « Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of Staphylococcus aureus strains isolated from cows with mastitis ». *Journal of Clinical Microbiology* 40 (11): 4060-4067.

Goldammer, T, H Zerbe, A Molenaar, HJ Schuberth, RM Brunner, SR Kata, et HM Seyfert. 2004. « Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle ». *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 174 - 185.

Gonzalez-Rodriguez, MC, C Gonzalo, F San Primitivo, et P Carmenes. 1995. « Relationship between somatic cell count and intramammary infection of the half udder in dairy ewes ». *J. Dairy Sci.* 78 (12): 2753-2759.

Griesbeck-Zilch, B, HHD Meyer, CH Kuhn, M Schwerin, et O Wellnitz. 2008. « Staphylococcus aureus and Escherichia coli cause deviating expression profiles of cytokines and lactoferrin messenger ribonucleic acid in mammary epithelial cells ». *J. Dairy Sci.* 91 (6): 2215-2224.

Griesbeck-Zilch, B, M Osman, C Kuhn, M Schwerin, RH Bruckmaier, MW Pfaffl, A Hammerle-Fickinger, HHD Meyer, et O Wellnitz. 2009. « Analysis of key molecules of the innate immune system in mammary epithelial cells isolated from marker-assisted and conventionally selected cattle ». *J. Dairy Sci.* 92 (9): 4621-4633.

Grosclaude, F, MF Mahé, JC Mercier, et B Ribadeau-Dumas. 1972. « [Characterization of genetic variants of a S1 and bovine caseins] ». *European Journal of Biochemistry / FEBS* 26 (3): 328-337.

Guidry, AJ, et RH Miller. 1986. « Immunoglobulin isotype concentrations in milk as affected by stage of lactation and parity ». *J. Dairy Sci*69 (7): 1799-1805.

Gunther, J, K Esch, N Poschadel, W Petzl, H Zerbe, S Mitterhuemer, H Blum, et HM Seyfert. 2011. « Comparative kinetics of Escherichia coli- and Staphylococcus aureus-specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that S. aureus elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha ». *Infect Immun.* 79 (2): 695-707.

Gunther, J, D Koczan, W Yang, G Nurnberg, D Repsilber, HJ Schuberth, Z Park, N Maqbool, A Molenaar, et H M Seyfert. 2009. « Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with Escherichia coli ». *Vet Res* 40 (4).

Gutiérrez-Gil, B, MF El-Zarei, Y Bayón, L Álvarez, LF de la Fuente, F San Primitivo, et JJ Arranz. 2007. « Short Communication: Detection of Quantitative Trait Loci Influencing Somatic Cell Score in Spanish Churra Sheep ». *J. Dairy Sci*90 (1): 422-426.

Hamann, J, et A Zecconi. 1998. « Evaluation of the electrical conductivity of milk as a mastitis indicator ». *IDF bulletin 334, International Dairy Federation*.

Hammad, H, et BN Lambrecht. 2011. « Dendritic cells and airway epithelial cells at the interface between innate and adaptive immune responses ». *Allergy* 66 (5): 579-587.

Hampton, T. 2004. « Bovine Genome Sequenced ». *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 292 (20): 2457.

Harmon, RJ. 1994. « Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts ». *J Dairy Sci* 77: 2103 - 2112.

Hart, DN, et JW Fabre. 1981. « Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain ». *The Journal of Experimental Medicine* 154 (2): 347-361.

Heringstad, B, G Klemetsdal, et J Ruane. 1999. « Clinical mastitis in Norwegian cattle: frequency, variance components, and genetic correlation with protein yield ». *J Dairy Sci* 82 (6): 1325-30.

Heringstad, B, G Klemetsdal, et J Ruane. 2000. « Selection for mastitis in dairy cattle: a review with focus on the situation of the Nordic countries. » *Livest. Prod. Sci.* 64 (1): 95-106.

Heringstad, B, G Klemetsdal, et T Steine. 2007. « Selection responses for disease resistance in two selection experiments with Norwegian red cows ». *J Dairy Sci* 90 (5): 2419-26.

Heyneman, R, C Burvenich, et R Vercauteren. 1990. « Interaction between the respiratory burst activity of neutrophil leukocytes and experimentally induced Escherichia coli mastitis in cows ». *J. Dairy Sci*73 (4): 985-994.

Hillerton, JE, JW Pankey, et P Pankey. 2002. « Effect of Over-Milking on Teat Condition ». *Journal of Dairy Research* 69 (01): 81-84.

Hirsch, T, F Jacobsen, HU Steinau, et L Steinstraesser. 2008. « Host defense peptides and the new line of defence against multiresistant infections ». *Protein and Peptide Letters* 15 (3): 238-243.

Hoebe, K, E Janssen, et B Beutler. 2004. « The interface between innate and adaptive immunity ». *Nat Immunol* 5 (10): 971-974.

Holland, DB, RA Bojar, MD Farrar, et KT Holland. 2009. « Differential innate immune responses of a living skin equivalent model colonized by Staphylococcus epidermidis or Staphylococcus aureus ». *FEMS Microbiol Lett* 290 (2): 149-155.

Houghton, A, McGarry, WO Hartzell, CS Robbins, FX Gomis-Ruth, et SD Shapiro. 2009. « Macrophage elastase kills bacteria within murine macrophages ». *Nature* 460 (7255):637-641.

Huang, Q, D Liu, P Majewski, LC Schulte, JM Korn, RA Young, ES Lander, et N Hacohen. 2001. « The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components ». *Science (New York, N.Y.)* 294 (5543): 870-875.

Hughes, TR, M Mao, AR Jones, J Burchard, M Marton, KW Shannon, SM Lefkowitz, et al. 2001. « Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer ». *Nature Biotechnology* 19 (4): 342-347.

Hunter, N 1997. « Molecular biology and genetics of scrapie in sheep ». *Ruvinsky A.*, The Genetics of Sheep édition.

Hutton, CT, LK Fox, et DD Hancock. 1990. « Mastitis control practices: differences between herds with high and low milk somatic cell counts ». *J. Dairy Sci*73 (4): 1135-1143.

Ioannidis, JPA, DB Allison, CA Ball, I Coulibaly, X Cui, AC Culhane, M Falchi, et al. 2009. « Repeatability of published microarray gene expression analyses ». *Nat Genet* 41 (2): 149-155.

Iwasaki, A, et R Medzhitov. 2004. « Toll-like receptor control of the adaptive immune responses ». *Nat Immunol* 5 (10): 987-995.

Janeway, CA, Jr, et R Medzhitov. 2002. « Innate immune recognition ». *Annual Review of Immunology* 20: 197-216.

Jensen, NE, et K Knudsen. 1991. « Interquarter comparison of markers of subclinical mastitis: somatic cell count, electrical conductivity, N-acetyl-beta-glucosaminidase and antitrypsin ». *The Journal of Dairy Research* 58 (4): 389-399.

Jiang, Y, et BP Dalrymple. 2011. Sequencing and assembly of the sheep genome reference sequence présenté à 3SR meeting, mai, Lodi, Italy.

Joshi, K, P Monaghan, et AM Neville. 1985. « Ultrastructural identification of Ia positive dendritic cells in the lactating rat mammary gland ». *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology* 406 (1): 17-25.

Jungi, TW, K Farhat, IA Burgener, et D Werling. 2010. « Toll-like receptors in domestic animals ». *Cell and Tissue Research* 343 (1): 107-120.

Kadowaki, N, S Ho, S Antonenko, RW Malefyt, RA Kastelein, F Bazan, et YJ Liu. 2001. « Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and

respond to different microbial antigens ». *The Journal of Experimental Medicine* 194 (6): 863-869.

Van Kampen, C, et BA Mallard. 1997. « Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 59 (1-2): 79-91.

Kane, MD, TA Jatkoe, CR Stumpf, J Lu, JD Thomas, et SJ Madore. 2000. « Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays ». *Nucleic Acids Research* 28 (22): 4552-4557.

Katz, JB, AJ Muller, et GC Prendergast. 2008. « Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape ». *Immunological Reviews* 222: 206-221.

Kehrli, ME, JL Burton, BJ Nonnecke, et EK Lee. 1999. « Effects of stress on leukocyte trafficking and immune responses: implications for vaccination ». *Advances in Veterinary Medicine* 41: 61-81.

Kehrli, ME, et DE Shuster. 1994. « Factors affecting milk somatic-cells and their role in health of the bovine mammary gland ». *J Dairy Sci* 77 (2): 619-627.

Kehrli, ME, JP Goff, MG Stevens, et TC Boone. 1991. « Effects of granulocyte colony-stimulating factor administration to periparturient cows on neutrophils and bacterial shedding ». *J. Dairy Sci*74 (8): 2448-2458.

Kelm, SC, JC Detilleux, AE Freeman, ME Kehrli Jr, AB Dietz, LK Fox, JE Butler, I Kasckovics, et DH Kelley. 1997. « Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle ». *J. Dairy Sci*80 (8): 1767-1775.

Khatkar, MS, PC Thomson, I Tammen, et H W Raadsma. 2004. « Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. » *Genet Sel Evol* 36: 163-190.

Kielian, T, ED Bearden, AC Baldwin, et N Esen. 2004. « IL-1 and TNF-alpha play a pivotal role in the host immune response in a mouse model of Staphylococcus aureus-induced experimental brain abscess ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 63 (4): 381-396.

Kishimoto, TK, MA Jutila, EL Berg, et EC Butcher. 1989. « Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors ». *Science (New York, N.Y.)* 245 (4923): 1238-1241.

Kobayashi, Y. 2008. « The role of chemokines in neutrophil biology ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 13: 2400-2407.

Koivula, M, EA Mäntysaari, E Negussie, et T Serenius. 2005. « Genetic and phenotypic relationships among milk yield and somatic cell count before and after clinical mastitis ». *J. Dairy Sci*88 (2): 827-833.

Kontoyiannis, D, M Pasparakis, TT Pizarro, F Cominelli, et G Kollias. 1999. « Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies ». *Immunity* 10 (3): 387-398.

Korhonen, H, P Marnila, et HS Gill. 2000. « Milk immunoglobulins and complement factors ». *Br J Nutr* 84 (Supplement S1): 75-80.

Kühn, C, J Bennewitz, N Reinsch, N Xu, H Thomsen, C Looft, GA Brockmann, et al. 2003. « Quantitative trait loci mapping of functional traits in the German Holstein cattle population ». *J. Dairy Sci*86 (1): 360-368.

Kuhn, C, F Reinhardt, et M Schwerin. 2008. « Marker assisted selection of heifers improved milk somatic cell countcompared to selection on conventional pedigree breeding values ». *Arch. Tierz., Dummerstorf*, 51 édition, sect. 1.

Laevens, H, H Deluyker, YH Schukken, L De Meulemeester, R Vandermeersch, E De Muêlenaere, et A De Kruif. 1997. « Influence of parity and stage of lactation on the somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows ». *J. Dairy Sci*80 (12): 3219-3226.

Lagriffoul, G, D Bergonier, X Berthelot, M Jacquin, P Guillouet, et F Barillet. 1996. Facteurs de variation génétiques et non génétiques des comptages de cellules somatiques du lait de brebis en relation avec les caractères laitiers et les mesures portant sur le lait de tank. International Symposium présenté à roceedings of Somatic cells and milk of Small Ruminants, Bella, Italy, pp149-155.

Lahouassa, H, E Moussay, P Rainard, et C Riollet. 2007. « Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to Staphylococcus aureus and Escherichia coli ». *Cytokine* 38 (1): 12-21.

Lande, R, D Ganguly, V Facchinetti, L Frasca, C Conrad, J Gregorio, S Meller, et al. 2011. « Neutrophils Activate Plasmacytoid Dendritic Cells by Releasing Self-DNA–Peptide Complexes in Systemic Lupus Erythematosus ». *Science Translational Medicine* 3 (73): 73ra19.

Lee, A, MK Whyte, et C Haslett. 1993. « Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators ». *Journal of Leukocyte Biology* 54 (4): 283-288.

Lee, CS, FBWooding, et P Kemp. 1980. « Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows ». *The Journal of Dairy Research* 47 (1): 39-50.

Lee, JW, DD Bannerman, MJ Paape, MK Huang, et X Zhao. 2006. « Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with Escherichia coli or Staphylococcus aureus by real-time PCR ». *Veterinary Research* 37 (2): 219-229.

Lee, JW, CN O'Brien, AJ Guidry, MJ Paape, KA Shafer-Weaver, et X Zhao. 2005. « Effect of a trivalent vaccine against Staphylococcus aureus mastitis lymphocyte subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis ». *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Vétérinaire* 69 (1): 11-18.

Lee, M, C Xiang, J Trent, et M Bittner. 2007. « Performance characteristics of 65-mer oligonucleotide microarrays ». *Analytical Biochemistry* 368 (1) (septembre): 70-78.

Lee, MLT. 2004. *Analysis of microarray gene expression data*. Kluwer Academic Publishers.

Lee, SS, N Yang Fu, SK Sukumaran, K Fei Wan, Q Wan, et VC Yu. 2009. « TRIM39 is a MOAP-1-binding protein that stabilizes MOAP-1 through inhibition of its poly-ubiquitination process ». *Experimental Cell Research* 315 (7): 1313-1325.

Legarra, A, et E Ugarte. 2005. « Genetic parameters of udder traits, somatic cell score, and milk yield in Latxa sheep ». *J. Dairy Sci*88 (6): 2238-2245.

Leitner, G, E Lubashevsky, et Z Trainin. 2003. « Staphylococcus aureus vaccine against mastitis in dairy cows, composition and evaluation of its immunogenicity in a mouse model ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 93 (3-4): 159-167.

Leitner, G, B Yadlin, A Glickman, M Chaffer, et A Saran. 2000. « Systemic and local immune response of cows to intramammary infection with Staphylococcus aureus ». *Research in Veterinary Science* 69 (2): 181-184.

Leitner, G, N Yadlin, E Lubashevsy, E Ezra, A Glickman, M Chaffer, M Winkler, A Saran, et Z Trainin. 2003. « Development of a Staphylococcus aureus vaccine against mastitis in dairy cows. II. Field trial ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 93 (3-4): 153-158.

Lerondelle, C, Y Richard, et J Issartial. 1992. « Factors affecting somatic cell counts in goat milk » 8 (1): 129-139.

Lerray, O. 1999. Méthodes de comptage des cellules du lait et contrôle qualité. Pp85-90 présenté à Journées nationales GTV INRA, session: les cellules somatiques du lait, Nantes.

Leung-Theung-Long, S, et S Guerder. 2008. « Les cellules Th17: Une nouvelle population de cellules T CD4 effectrices pro-inflammatoires ». *MEDECINE/SCIENCES:* 24: 972-6.

Lin, L, AS Ibrahim, X Xu, JM Farber, V Avanesian, B Baquir, Y Fu, SW French, JE Edwards Jr, et B Spellberg. 2009. « Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against Staphylococcus aureus and Candida albicans infection in mice ». *PLoS Pathogens* 5 (12): e1000703.

Ling, B, et J Alcorn. 2010. « LPS-induced inflammation downregulates mammary gland glucose, fatty acid, and l-carnitine transporter expression at different lactation stages ». *Research in Veterinary Science* 89 (2): 200-202.

Lokuta, MA, PA Nuzzi, et A Huttenlocher. 2003. « Calpain regulates neutrophil chemotaxis ». *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (7): 4006-4011.

Lostrie-Trussar, N, JJ Letesson, et A Depelchin. 1984. « Etude des fonctionsphagocytaire et bactericide des polymorphonuceaires sanguins chez des taureauxet leurs produits males dans la race bleu blanc belge ». *Ann Med Vet*, sect. 128.

Lutzow, SYC, L Donaldson, CP Gray, T Vuocolo, RD Pearson, A Reverter, KA Byrne, PA Sheehy, R Windon, et RL Tellam. 2008. « Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to Staphylococcus aureus infection ». *BMC Vet Res* 4 (18).

Lutzow, SYC, C Gray, T Vuocolo, L Donaldson, M Broadway, et R Tellam. 2005. « Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells ». *Cytokine* 31 (1): 72-86.

Macdonald, EA, L Xia, H Monardes, et JD Turner. 1994. « Neutrophil Function In Vitro: Diapedesis and Phagocytosis ». *J. Dairy Sci*77 (2): 628-638.

Mamo, W, P Jonsson, JI Flock, M Lindberg, HP Müller, T Wadström, et L Nelson. 1994. « Vaccination against Staphylococcus aureus mastitis: immunological response of mice vaccinated with fibronectin-binding protein (FnBP-A) to challenge with S. aureus ». *Vaccine* 12 (11): 988-992.

Marogna, G, S Rolesu, St Lollai, S Tola, et G Leori. 2010. « Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis ». *Small Ruminant Research* 88 (2-3): 119-125.

Martinez-Pulgarin, S, G Dominguez-Bernal, JA Orden, et R de la Fuente. 2009. « Simultaneous lack of catalase and beta-toxin in Staphylococcus aureus leads to increased intracellular survival in macrophages and epithelial cells and to attenuated virulence in murine and ovine models ». *Microbiology* 155 (5): 1505-1515.

Matthews, KR, RA Almeida, et SP Oliver. 1994. « Bovine mammary epithelial cell invasion by Streptococcus uberis. » *Infect. Immun.* 62 (12): 5641-5646.

Medzhitov, R 2009. « Damage control in host-pathogen interactions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (37): 15525-15526.

Middleton, JR, CD Luby, et D Scott Adams. 2009. « Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: a review and new data ». *Veterinary Microbiology* 134 (1-2): 192-198.

Middleton, JR, J Ma, CL Rinehart, VN Taylor, CD Luby, et BJ Steevens. 2006. « Efficacy of different Lysigin formulations in the prevention of Staphylococcus aureus intramammary infection in dairy heifers ». *The Journal of Dairy Research* 73 (1): 10-19.

Miller, LS, RM O'Connell, MA Gutierrez, EM Pietras, A Shahangian, CE Gross, A Thirumala, AL Cheung, G Cheng, et RL Modlin. 2006. « MyD88 mediates neutrophil recruitment initiated by IL-1R but not TLR2 activation in immunity against Staphylococcus aureus ». *Immunity* 24 (1): 79-91.

Miller, MB, et YW Tang. 2009. « Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology ». *Clin. Microbiol. Rev.* 22 (4): 611-633.

Miller, RH. 1984. « Traits for sire selection related to udder health and management ». *J. Dairy Sci*67 (2): 459-471.

Miller, RH, AJ Guidry, MJ Paape, AM Dulin, et LA Fulton. 1988. « Relationship between immunoglobulin concentrations in milk and phagocytosis by bovine neutrophils ». *American Journal of Veterinary Research* 49 (1): 42-45.

Miller, SI, RK Ernst, et MW Bader. 2005. « LPS, TLR4 and infectious disease diversity ». *Nat Rev Microbiol* 3: 36 - 46.

Moreilhon, C, D Gras, C Hologne, O Bajolet, F Cottrez, V Magnone, M Merten, H Groux, E Puchelle, et P Barbry. 2005. « Live Staphylococcus aureus and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells ». *Physioll Genomics* 20 (3): 244-255.

Morgante, M, S Ranucci, M Pauselli, C Casoli, et E Duranti. 1996. « Total and differential cell count in milk of primiparous Comisana ewes without clinical signs of mastitis ». *Small Ruminant Research* 21 (3): 265-271.

Mrode, RA, et GJT Swanson. 1996. « Genetic and statistical properties of somatic cell count and its suitability as an indirect means of reducing the incidence of mastitis in dairy cattle ». *Anim. Breed. Abstr.* 64 (11): 847-857.

Murphy, KA, L Quadro, et LA White. 2007. The intersection between the aryl hydrocarbon receptor (AHR)- and retinoic acid-signaling pathways. Dans *Vitamin A*, 75:33-67.

Nakahara, T, Y Moroi, H Uchi, et M Furue. 2006. « Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement ». *Journal of Dermatological Science* 42 (1): 1-11.

National Mastitis Council. 1996. « Current concepts of bovine mastitis », 4th edition édition.

Neave, FK, FH Dodd, RG Kingwill, et DR Westgarth. 1969. « Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management ». *J. Dairy Sci*52 (5): 696-707.

Nielen, M, H Deluyker, YH Schukken, et A Brand. 1992. « Electrical conductivity of milk: measurement, modifiers, and meta analysis of mastitis detection performance ». *J. Dairy Sci*75 (2): 606-614.

Niemialtowski, M, BJ Nonnecke, et SP Targowski. 1988. « Phagocytic activity of milk leukocytes during chronic staphylococcal mastitis ». *J. Dairy Sci*71 (3): 780-787.

Nippe, N, G Varga, D Holzinger, B Löffler, E Medina, K Becker, J Roth, JM Ehrchen, et C Sunderkötter. 2011. « Subcutaneous infection with S. aureus in mice reveals association of resistance with influx of neutrophils and Th2 response ». *The Journal of Investigative Dermatology* 131 (1): 125-132.

Norberg, E, H Hogeveen, IR Korsgaard, NC Friggens, KH Sloth, P Lovendahl. 2004. « Electrical conductivity of milk: ability to predict mastitis status ». *J. Dairy Sci*. 87, 1099–1107.

O'Brien, CN, AJ Guidry, LW Douglass, et DC Westhoff. 2001. « Immunization with Staphylococcus aureus lysate incorporated into microspheres ». *J. Dairy Sci*84 (8): 1791-1799.

Ogola, H, A Shitandi, et J Nanua. 2007. « Effect of mastitis on raw milk compositional quality ». *Journal of Veterinary Science* 8 (3): 237-242.

Ogorevc, J, T Kunej, A Razpet, et P Dovc. 2009. « Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis ». *Anim Genet* 40 (6): 832-51.

Othmane, MH, LF De La Fuente, JA Carriedo, et F San Primitivo. 2002. « Heritability and genetic correlations of test day milk yield and composition, individual laboratory cheese yield, and somatic cell count for dairy ewes ». *J. Dairy Sci*85 (10): 2692-2698.

Paape, MJ, et AV Capuco. 1997. « Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats ». *Journal of Animal Science* 75 (2): 556-565.

Paape, MJ, K Shafer-Weaver, AV Capuco, K Van Oostveldt, et C Burvenich. 2000. « Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 480: 259-277.

Paape, MJ, DD Bannerman, X Zhao, et J W Lee. 2003. « The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk ». *Vet. Res.* 34 (5): 597-627.

Paape, MJ, J Mehrzad, X Zhao, JC Detilleux, et C Burvenich. 2002. « Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes ». *J Mammary Gland Biol* 7 (2): 109-21.

Paape, MJ, K Van Oostveldt, et E Meyer. 1999. Phagocytic defense of the bovine mammary gland. Dans Nantes.

Pankey, JW, NT Boddie, JL Watts, et SC Nickerson. 1985. « Evaluation of protein A and a commercial bacterin as vaccines against Staphylococcus aureus mastitis by experimental challenge ». *J. Dairy Sci*68 (3): 726-731.

Pareek, R, O Wellnitz, R Van Dorp, J Burton, et D Kerr. 2005. « Immunorelevant gene expression in LPS-challenged bovine mammary epithelial cells ». *J Appl Genet* 46 (2): 171-7.

Park, YH, LK Fox, MJ Hamilton, et WC Davis. 1992. « Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation ». *J. Dairy Sci*75 (4): 998-1006.

Paulrud, CO. 2005. « Basic concepts of the bovine teat canal ». *Veterinary Research Communications* 29 (3): 215-245.

Pawitan, Y, S Michiels, S Koscielny, A Gusnanto, et A Ploner. 2005. « False discovery rate, sensitivity and sample size for microarray studies ». *Bioinformatics* 21 (13): 3017 - 3024.

Pearson, JK, et DP Mackie. 1979. « Factors associated with the occurrence, cause and outcome of clinical mastitis in dairy cattle ». *The Veterinary Record* 105 (20): 456-463.

Peli, A, A Scagliarini, D Britti, et A Boari. 2003. « Detection of proinflammatory and regulatory cytokines in bovine milk using RT-PCR ». *Veterinary Research Communications* 27 Suppl 1: 779-781.

Persson, K, I Larsson, et C Hallén Sandgren. 1993. « Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vivo and in vitro ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 37 (2): 99-112.

Phillips, I, M Casewell, T Cox, B De Groot, C Friis, RJones, C Nightingale, R Preston, et J Waddell. 2004. « Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53 (1): 28-52.

Pisoni, G, P Moroni, S Genini, A Stella, PJ Boettcher, P Cremonesi, L Scaccabarozzi, E Giuffra, et B Castiglioni. 2010. « Differentially expressed genes associated with Staphylococcus aureus mastitis in dairy goats ». *Vet Immunol Immunop* 135 (3-4): 208-217.

Plozza, K, JJ Lievaart, G Potts, et HW Barkema. 2011. « Subclinical mastitis and associated risk factors on dairy farms in New South Wales ». *Australian Veterinary Journal* 89 (1-2): 41-46.

Poutrel, B. 1983. « La sensibilité aux mammites : revue des facteurs liés à la vache ». *Ann Rech Vét*, sect. 14.

Poutrel, B. 1985. « Généralités sur les mammites de la vache laitière, processus infectieux, épidémiologie, diagnostic, méthodes de contrôle ». *Rec. Méd. Vét.*, sect. 161, (6-7).

Pyorala, S, et E Pyorala. 1997. « Accuracy of methods using somatic cell count and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in milk to assess the bacteriological cure of bovine clinical mastitis ». *J. Dairy Sci*80 (11): 2820-2825.

Pyorala, S. 2003. « Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis ». *Veterinary Research* 34 (5): 565-578.

Rainard, P. 2003. « The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections ». *Vet Res* 34: 647 - 670.

Rainard, P, et B Poutrel. 1995. « Deposition of complement components on Streptococcus agalactiae in bovine milk in the absence of inflammation ». *Infect Immun* 63: 3422 - 3427.

Rainard, P, et C Riollet. 2003. « Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland ». *Reprod. Nutr. Dev.* 43 (5): 439-457.

Rainard, P, et C Riollet. 2006. « Innate immunity of the bovine mammary gland ». *Veterinary Research* 37 (3): 369-400.

Rainard, P, A Fromageau, P Cunha, et FB Gilbert. 2008. « Staphylococcus aureus lipoteichoic acid triggers inflammation in the lactating bovine mammary gland ». *Vet Res* 39 (5): 13.

Rainard, P, JC Corrales, M Belén Barrio, T Cochard, et B Poutrel. 2003. « Leucotoxic activities of Staphylococcus aureus strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF'-PV leukotoxin ». *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10 (2): 272-277.

Rainard, P, et Bernard P. 1993. *Protection Immunitaire de la glande mammaire In Biologie de la lactation*. Ed INSERM/INRA.

Rainard, P, C Riollet, P Berthon, P Cunha, A Fromageau, C Rossignol, et FB Gilbert. 2008. « The chemokine CXCL3 is responsible for the constitutive chemotactic activity of bovine milk for neutrophils ». *Molecular Immunology* 45 (15): 4020-4027.

Ray, SS, et HI Swanson. 2003. « Alteration of keratinocyte differentiation and senescence by the tumor promoter dioxin ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 192 (2): 131-145.

Raynal-Ljutovac, K, P Gaborit, et A Lauret. 2005. « The relationship between quality criteria of goat milk, its technological properties and the quality of the final products ». *Small Ruminant Research* 60 (1-2): 167-177.

Reis, ES, JAM Barbuto, et L Isaac. 2007. « Complement components, regulators and receptors are produced by human monocyte-derived dendritic cells ». *Immunobiology* 212 (3): 151-157.

Reneau, JK. 1986. « Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control ». *J. Dairy Sci*69 (6): 1708-1720.

Rescigno, M, U Lopatin, et M Chieppa. 2008. « Interactions among dendritic cells, macrophages, and epithelial cells in the gut: implications for immune tolerance ». *Current Opinion in Immunology* 20 (6): 669-675.

Riggio, V, R Finocchiaro, JBCHM van Kaam, B Portolano, et H Bovenhuis. 2007. « Parameters for milk somatic cell score and relationships with production traits in primiparous dairy sheep ». *J. Dairy Sci*90 (4): 1998-2003.

Rinaldi, M, RW Li, DD Bannerman, KM Daniels, C Evock-Clover, MVB Silva, MJ Paape, B Van Ryssen, C Burvenich, et AV Capuco. 2010. « A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to E. coli mastitis ». *Functional & Integrative Genomics* 10 (1): 21-38.

Rinaldi, M, RW Li, et AV Capuco. 2010. « Mastitis associated transcriptomic disruptions in cattle ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 138 (4): 267-279.

Riollet, C, P Rainard, et B Poutrel. 2000a. « Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 480: 247-258.

Riollet, C, P Rainard, et B Poutrel. 2000b. « Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with Escherichia coli and Staphylococcus aureus ». *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7 (2): 161-167.

Riollet, C, P Rainard, et B Poutrel. 2001. « Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic Staphylococcus aureus infection ». *J. Dairy Sci.* 84 (5): 1077-1084.

Riollet, C, P Rainard, et B Poutrel. 1999. Cinétiques de recrutement cellulaire et de multiplication bactérienne après infection. présenté à Actes Journées nationales GTV-INRA, pp67-73, mai 26, Nantes.

Rooijakkers, SHM, KPM van Kessel, et JAG van Strijp. 2005. « Staphylococcal innate immune evasion ». *Trends in Microbiology* 13 (12): 596-601.

Le Roux, Y, O Colin, et F Laurent. 1995. « Proteolysis in samples of quarter milk with varying somatic cell counts. 1. Comparison of some indicators of endogenous proteolysis in milk ». *J. Dairy Sci*78 (6): 1289-1297.

Le Roux, Y, F Laurent, et F Moussaoui. 2003. « Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change ». *Veterinary Research* 34 (5): 629-645.

Rozen, S, et H Skaletsky. 2000. « Primer3 on the www for general users and for biologist programmers ». *Method Mol Biol* 132: 365 - 386.

Rupp, R, G Lagriffoul, JM Astruc, et F Barillet. 2003. « Genetic parameters for milk somatic cell scores and relationships with production traits in French Lacaune dairy sheep ». *J. Dairy Sci*86 (4): 1476-1481.

Rupp, R, G Sallé, F Barillet, H Larroque, et C Moreno-Romieux. 2011. « Genome wide association study of somatic cell counts in a grand-daughter design of French Lacaune AI rams ». *62nd annual Meeting EAAP*.

Rupp, R, JM Astruc, G Lagriffoul, D Boichard, A Barbat, et F Barillet. 2002. Evaluation génétique des béliers Lacaune sur les comptages de cellules somatiques pour l'amélioration de la résistance aux mammites. Dans *Renc. Rech. Ruminants*. Vol. 10.

Rupp, R, D Bergonier, S Dion, MC Hygonenq, MR Aurel, C Robert-Granié, et G Foucras. 2009. « Response to somatic cell count-based selection for mastitis resistance in a divergent selection experiment sheep ». *J. Dairy Sci.* 92: 1203-1219.

Rupp, R, V Clément, A Piacere, C Robert-Granié, et E Manfredi. 2011. « Genetic parameters for milk somatic cell score and relationship with production and udder type traits in dairy Alpine and Saanen primiparous goats ». *J. Dairy Sci*94 (7): 3629-3634.

Rupp, R, et G Foucras. 2010. *Genetics of mastitis in dairy ruminants In Bishop SC, Axford RFE, Nicholas FW Breeding for disease resistance in farm animals*. Vol. 3. CABI. Bishop, S.C.

Rupp, R. 2010. « La sélection des ruminants laitiers pour des numérations cellulaires faibles et les conséquences sur leur sensibilité aux mammites ». *bulletin des gtv*, sect. 54.

Rupp, R, C Bonnefont, D Bergonier, MR Aurel, P. Martin, P Jacquiet, C Moreno, C Robert-Granie, P Rainard, et G Foucras. 2010. An Integrated Genomics Approach Towards Analysis Of Resistance To Mastitis In Ruminants. Dans Leipsig, Germany.

Rupp, R, et D Boichard. 2003. « Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle ». *Vet. Res.* 34 (5): 671-688.

Rupp, R, L Schibler, E Cribiu, Y Amigues, MY Boscher, L Mura, T Sechi, et al. 2003. « Evidence of chromosomal regions controlling somatic cell countsin dairy sheep from two QTL detection projects. » *Proceeding of the International workshop on major genes and QTL in sheep and goat*.

Sahay, B, RL Patsey, CH Eggers, JC Salazar, JD Radolf, et TJ Sellati. 2009. « CD14 Signaling Restrains Chronic Inflammation through Induction of p38-MAPK/SOCS-Dependent Tolerance ». *PLoS Pathog* 5 (12): e1000687.

Salojin, KV, IB Owusu, KA Millerchip, M Potter, KA Platt, et T Oravecz. 2006. « Essential Role of MAPK Phosphatase-1 in the Negative Control of Innate Immune Responses ». *The Journal of Immunology* 176 (3): 1899 -1907.

Schepers, AJ, TJ Lam, YH Schukken, JB Wilmink, et WJ Hanekamp. 1997. « Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters ». *J. Dairy Sci*80 (8): 1833-1840.

Schmitz, S, MW Pfaffl, HH Meyer, et RM Bruckmaier. 2004. « Short-term changes of mRNA expression of various inflammatory factors and milk proteins in mammary tissue during LPS-induced mastitis ». *Domest Anim Endocrinol* 26: 111 - 126.

Schrenk, D, HJ Schmitz, S Bohnenberger, B Wagner, et W Wörner. 2004. « Tumor promoters as inhibitors of apoptosis in rat hepatocytes ». *Toxicology Letters* 149 (1-3): 43-50.

Schroeder, A, O Mueller, S Stocker, R Salowsky, M Leiber, M Gassmann, S Lightfoot, W Menzel, M Granzow, et T Ragg. 2006. « The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements ». *BMC Molecular Biology* 7: 3.

Schuchhardt, J, D Beule, A Malik, E Wolski, H Eickhoff, H Lehrach, et H Herzel. 2000. « Normalization strategies for cDNA microarrays ». *Nucleic Acids Research* 28 (10): E47.

Schukken, YH, BA Mallard, JC Dekkers, KE Leslie, et M Stear. 1994. « Genetic impact on the risk of intramammary infection following Staphylococcus aureus challenge ». *J. Dairy Sci*77 (2): 639-647.

Schukken, YH, RN González, LL Tikofsky, HF Schulte, CG Santisteban, FL Welcome, GJ Bennett, MJ Zurakowski, et RN Zadoks. 2009. « CNS mastitis: nothing to worry about? » *Veterinary Microbiology* 134 (1-2): 9-14.

Schwerin, M, D Czernek-Schafer, T Goldammer, S Kata, J Womack, R Pareek, C Pareek, K Walawski, et R Brunner. 2003. « Application of disease-associated differentially expressed genes - Mining for functional candidate genes for mastitis resistance in cattle ». *Genet Sel Evol* 35 (Suppl 1): S19 - S34.

Seegers, H, C Fourichon, et F Beaudeau. 2003. « Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds ». *Veterinary Research* 34 (5): 475-491.

Seegers, Hi, JL Menard, et C Fourichon. 1997. Mammites en élevage bovin laitier: importance actuelle, épidémiologie et plans de prévention. Dans Vol. 4.

Serieys, F. 1985a. « Interprétation de concentration cellulaires du lait individuel du lait de la vache pour le diagnostic de l'état d'infection mammaire ». *Ann Rech Vét*, sect. 16.

Serieys, F. 1985b. « Concentration cellulaire du lait individuel de vache: influence de l'état d'infection mammaire, du numéro de lactation et de la production laitière ». *Ann Rech Vét*, sect. 16.

Serieys, F, J Auclair, et B Poutrel. 1987. *Influence des infections mammaires sur la composition chimique du lait. In : Le lait, matière première de l'industrie laitière*. INRA-CEPIC.

Serrano, M, MD Pérez-Guzmán, V Montoro, et JJ Jurado. 2003. « Genetic analysis of somatic cell count and milk traits in Manchega ewes: Mean lactation and test-day approaches ». *Livestock Production Science* 84 (1): 1-10.

Shafer-Weaver, KA, CM Corl, et LM Sordillo. 1999. « Shifts in bovine CD4+ subpopulations increase T-helper-2 compared with T-helper-1 effector cells during the postpartum period ». *J. Dairy Sci*82 (8): 1696-1706.

Shuster, DE, ME Kehrli Jr, P Rainard, et M Paape. 1997. « Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with Escherichia coli ». *Infection and Immunity* 65 (8): 3286-3292.

da Silva, MCA, JM Zahm, D Gras, O Bajolet, M Abely, J Hinnrasky, M Milliot, et al. 2004. « Dynamic interaction between airway epithelial cells and Staphylococcus aureus ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 287 (3): L543-551.

Sladek, Z, D Rysanek, H Ryznarova, et M Faldyna. 2005. « Neutrophil apoptosis during experimentally induced Staphylococcus aureus mastitis ». *Veterinary Research* 36 (4): 629-643.

Smaragdov, MG 2006. « Genetic mapping of loci responsible for milk quality parameters in dairy cattle. » *Genetika* 42 (1): 5-21.

Smits, E, C Burvenich, AJ Guidry, R Heyneman, et A Massart-Leën. 1999. « Diapedesis across mammary epithelium reduces phagocytic and oxidative burst of bovine neutrophils ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 68 (2-4): 169-176.

Smolenski, GA, RJ Wieliczko, S M Pryor, MK Broadhurst, TT Wheeler, et BJ Haigh. 2011. « The abundance of milk cathelicidin proteins during bovine mastitis ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 143 (1-2): 125-130.

Smyth, GK. 2005. « Limma: linear models for microarray data ». *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*: 397 - 420.

Smyth, GK, et T Speed. 2003. « Normalization of cDNA microarray data ». *Methods (San Diego, Calif.)* 31 (4): 265-273.

Sobek, J, K Bartscherer, A Jacob, JD Hoheisel, et P Angenendt. 2006. « Microarray technology as a universal tool for high-throughput analysis of biological systems ». *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 9 (5): 365-380.

Sordillo, LM, K Shafer-Weaver, et D DeRosa. 1997. « Immunobiology of the mammary gland ». *J. Dairy Sci*80 (8): 1851-1865.

Sordillo, LM 2005. « Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility ». *Livest Prod Sci* 98 (1-2): 89-99.

Sordillo, LM, et KL Streicher. 2002. « Mammary gland immunity and mastitis susceptibility ». *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 7 (2): 135-146.

de Souza, VR, WK Cabrera, A Galvan, OG Ribeiro, M De Franco, F Vorraro, N Starobinas, S Massa, TA Dragani, et O M Ibañez. 2009. « Aryl hydrocarbon receptor polymorphism modulates DMBA-induced inflammation and carcinogenesis in phenotypically selected mice ». *Int J Cancer* 124 (6): 1478-1482.

Spohr, M, J Rau, A Friedrich, G Klittich, A Fetsch, B Guerra, JA Hammerl, et BA Tenhagen. 2011. « Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in three dairy herds in southwest Germany ». *Zoonoses and Public Health* 58 (4): 252-261.

Steinman, RM, et ZA Cohn. 1973. « Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution ». *The Journal of Experimental Medicine* 137 (5): 1142-1162.

Steinman, RM, et MD Witmer. 1978. « Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (10): 5132-5136.

Steinman, RM, G Kaplan, MD Witmer, et ZA Cohn. 1979. « Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro ». *The Journal of Experimental Medicine* 149 (1): 1-16.

Steinman, RM, D Hawiger, et MC Nussenzweig. 2003. « Tolerogenic dendritic cells ». *Annual Review of Immunology* 21: 685-711.

Stephensen, CB. 2001. « Vitamin A, infection, and immune function ». *Annu Rev Nutr* 21 (1): 167-192.

Stockinger, B, K Hirota, J Duarte, et M Veldhoen. 2011. « External influences on the immune system via activation of the aryl hydrocarbon receptor ». *Seminars in Immunology* 23 (2): 99-105.

Su, JM, P Lin, CK Wang, et H Chang. 2009. « Overexpression of cytochrome P450 1B1 in advanced non-small cell lung cancer: a potential therapeutic target ». *Anticancer Research* 29 (2): 509-515.

Sugimoto, M, A Fujikawa, JE Womack, et Y Sugimoto. 2006. « Evidence that bovine forebrain embryonic zinc finger-like gene influences immune response associated with mastitis resistance ». *P Natl Acad Sci USA* 103 (17): 6454-6459.

Supajatura, V, H Ushio, A Nakao, S Akira, K Okumura, C Ra, et H Ogawa. 2002. « Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity ». *The Journal of Clinical Investigation* 109 (10): 1351-1359.

Sutra, L, et B Poutrel. 1994. « Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to Staphylococcus aureus ». *J Med Microbiol* 40 (2): 79-89.

Swanson, KM, K Stelwagen, J Dobson, HV Henderson, SR Davis, VC Farr, et K Singh. 2009. « Transcriptome profiling of Streptococcus uberis-induced mastitis reveals fundamental differences between immune gene expression in the mammary gland and in a primary cell culture model ». *J. Dairy Sci.* 92 (117-129).

Takeuchi, O, K Hoshino, T Kawai, H Sanjo, H Takada, T Ogawa, K Takeda, et S Akira. 1999. « Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-Negative and Gram-Positive bacterial cell wall components ». *Immunity* 11 (4): 443-451.

Tao, WJ, et B Mallard. 2007. « Differentially expressed genes associated with Staphylococcus aureus mastitis of Canadian Holstein cows ». *Vet Immunol Immunop* 120 (3-4): 201-211.

Taraktsoglou, M, U Szalabska, DA Magee, JA Browne, T Sweeney, E Gormley, et DE MacHugh. 2011. « Transcriptional profiling of immune genes in bovine monocyte-derived macrophages exposed to bacterial antigens ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 140 (1-2): 130-139.

Taub, DD, AR Lloyd, JM Wang, JJ Oppenheim, et DJ Kelvin. 1993. « The effects of human recombinant MIP-1 alpha, MIP-1 beta, and RANTES on the chemotaxis and adhesion of T cell subsets ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 351: 139-146.

Taylor, PR, A Carugati, VA Fadok, HT Cook, M Andrews, MC Carroll, JS Savill, PM Henson, M Botto, et MJ Walport. 2000. « A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo ». *The Journal of Experimental Medicine* 192 (3): 359-366.

Tergaonkar, V, et ND Perkins. 2007. « p53 and NF-[kappa]B Crosstalk: IKK[alpha] Tips the Balance ». *Molecular Cell* 26 (2): 158-159.

Teuber, M 2001. « Veterinary use and antibiotic resistance ». *Current Opinion in Microbiology* 4 (5): 493-499.

The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, CG Elsik, Ross L Tellam, et KC Worley. 2009. « The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution ». *Science* 324 (5926): 522 -528.

The International Sheep Genomics Consortium, AL Archibald, NE Cockett, BP Dalrymple, T Faraut, J Kijas, JF Maddox, et al. 2010. « The sheep genome reference sequence: a work in progress ». *Animal Genetics*, sect. 41.

Theocharidis, A, S van Dongen, AJ Enright, et TC Freeman. 2009. « Network visualization and analysis of gene expression data using BioLayout Express(3D) ». *Nature Protocols* 4 (10): 1535-1550.

Tollersrud, T, PE Nørstebø, JP Engvik, SR Andersen, LJ Reitan, et A Lund. 2002. « Antibody responses in sheep vaccinated against Staphylococcus aureus mastitis: a comparison of two experimental vaccines containing different adjuvants ». *Veterinary Research Communications* 26 (8): 587-600.

Tomasinsig, L, M Zanetti. 2005. « The cathelicidins—structure, function and evolution ». Curr. Protein Pept. Sci. 6, 23–34.

Toufeer, M, C Bonnefont, E Foulon, C Caubet, C Tasca, MR Aurel, C Robert-Granié, R Rupp, et G Foucras. 2011. « Gene expression profiling of BM-derived dendritic cells reveals important mechanisms associated with predisposition to Staphylococcus infections ». *PLOS one* 6 (8): e22147.

Vandesompele, J, K De Preter, F Pattyn, B Poppe, N Van Roy, A De Paepe, et F Speleman. 2002. « Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes ». *Genome Biol* 3 (7): RESEARCH0034.

Veldhoen, M, K Hirota, AM Westendorf, JB, L Dumoutier, JC Renauld, et B Stockinger. 2008. « The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins ». *Nature* 453 (7191): 106-109.

Veldkamp, KE, KPM VanKessel, J Verhoef, et JA G VanStrijp. 1997. « Staphylococcal culture supernates stimulate human phagocytes ». *Inflammation* 21 (5): 541-551.

Vetillard, J, M Drouet, TM Neildez-Nguyen, JC Mestries, J Mathieu, D Thierry, et F Herodin. 1999. « Interleukine-8 acts as a strong peripheral blood granulocyte-recruiting agent rather than as a hematopoietic progenitor cell-mobilizing factor ». *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 8 (4): 365-379.

Vivier, E, et B Malissen. 2005. « Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited ». *Nature Immunology* 6 (1): 17-21.

Wagter, LC, BA Mallard, BN Wilkie, KE Leslie, PJ Boettcher, et JC Dekkers. 2000. « A quantitative approach to classifying Holstein cows based on antibody responsiveness and its relationship to peripartum mastitis occurrence ». *J. Dairy Sci*83 (3): 488-498.

Waller, KP. 2000. « Mammary gland immunology around parturition. Influence of stress, nutrition and genetics ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 480: 231-245.

Wang, Y, Y Li, X Qi, W Yuan, J Ai, C Zhu, L Cao, et al. 2004. « TRIM45, a novel human RBCC/TRIM protein, inhibits transcriptional activities of ElK-1 and AP-1 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323 (1): 9-16.

Watson, DL. 1988. « Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in ewes ». *Research in Veterinary Science* 45 (1): 16-21.

Watson, DL, ML McColl, et HI Davies. 1996. « Field trial of a staphylococcal mastitis vaccine in dairy herds: clinical, subclinical and microbiological assessments ». *Australian Veterinary Journal* 74 (6): 447-450.

Watts, JL 1988. « Etiological agents of bovine mastitis ». *Veterinary Microbiology* 16 (1): 41-66.

Weber, A, AT Weber, TL McDonald, et MA Larson. 2006. « Staphylococcus aureus lipotechoic acid induces differential expression of bovine serum amyloid A3 (SAA3) by mammary epithelial cells: Implications for early diagnosis of mastitis ». *Vet Immunol Immunop* 109 (1-2): 79-83.

Welbeck, K, P Leonard, N Gilmartin, B Byrne, C Viguier, S Arora, et R O'Kennedy. 2011. « Generation of an anti-NAGase single chain antibody and its application in a biosensor-based assay for the detection of NAGase in milk ». *Journal of Immunological Methods* 364 (1-2): 14-20.

Wellenberg, GJ, WHM van der Poel, et JT Van Oirschot. 2002. « Viral infections and bovine mastitis: a review ». *Veterinary Microbiology* 88 (1): 27-45.

Weller, JI, A Saran, et Y Zeliger. 1992. « Genetic and environmental relationships among somatic cell count, bacterial infection, and clinical mastitis ». *J. Dairy Sci*75 (9): 2532-2540.

Wells, SJ, SL Ott, et A Hillberg Seitzinger. 1998. « Key Health Issues for Dairy Cattle--New and Old ». *J. Dairy Sci.* 81 (11): 3029-3035.

Werling, D, et TJ Coffey. 2007. « Pattern recognition receptors in companion and farm animals - The key to unlocking the door to animal disease? » *The Veterinary Journal* 174 (2): 240-251.

Wicken, AJ, et KW Knox. 1970. « Studies on the group F antigen of lactobacilli: isolation of a teichoic acid-lipid complex from Lactobacillus fermenti NCTC 6991 ». *Journal of General Microbiology* 60 (3): 293-301.

Wiggans, GR, TS Sonstegard, PM VanRaden, LK Matukumalli, RD Schnabel, JF Taylor, FS Schenkel, et CP Van Tassell. 2009. « Selection of single-nucleotide polymorphisms and quality of genotypes used in genomic evaluation of dairy cattle in the United States and Canada ». *J. Dairy Sci*92 (7): 3431-3436.

Yang, W, H Zerbe, W Petzl, RM Brunner, J Gunther, C Draing, AS von, HJ Schuberth, et HM Seyfert. 2008. « Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from Staphylococcus aureus (S. aureus) and E. coli, but S. aureus fails to both activate NF-

kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder ». *Mol Immunol* 45: 1385 - 1397.

Yang, YH, et NP Thorne. 2003. Normalization for two-color cDNA microarray data. Dans *Institute of Mathematical Statistics Lecture Notes - Monograph Series*, 403-418. Beachwood, OH: Institute of Mathematical Statistics.

Yokoyama, T, A Komori, M Nakamura, Y Takii, T Kamihira, S Shimoda, T Mori, et al. 2006. « Human intrahepatic biliary epithelial cells function in innate immunity by producing IL6 and IL8 via the TLR4-NFκB and MAPK signaling pathways ». *Liver International* 26 (4): 467-476.

Zanetti, M, 2005. « The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals ». Curr. Issues Mol. Biol. 7, 179–196.

Zasloff, M. 2002. « Antimicrobial peptides in health and disease ». *The New England Journal of Medicine* 347 (15): 1199-1200.

Zoumpopoulou, G, E Tsakalidou, J Dewulf, B Pot, et C Grangette. 2009. « Differential crosstalk between epithelial cells, dendritic cells and bacteria in a co-culture model ». *Int J Food Microbiol* 131 (1): 40-51.