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 :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme JULIETTE BOUVIER-MULLER

le vendredi 15 septembre 2017

Titre :

Etude des interactions entre la prédisposition aux mammites et le statut énergétique en début de lactation

---

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage (GenPhySE)

Directeur(s) de Thèse :

M. GILLES FOUCRAS

MME RACHEL RUPP

Rapporteurs :

M. JUAN JOSE ARRANZ, UNIVERSIDAD DE LEON

Mme CLAIRE ROGEL GAILLARD, INRA JOUY EN JOSAS

Membre(s) du jury :

M. PHILIPPE SCHMIDELY, AGROPARISTECH, Président

Mme NATHALIE VIGUERIE, INSERM MIDI PYRENEES, Membre

Je tiens tout d'abord à remercier les personnes qui vont lire ce manuscrit de thèse, en particulier ceux qui ont accepté d'en être les rapporteurs : Claire Rogel-Gaillard et Juan-Jose Arranz. J'ai essayé de le rendre clair et agréable à lire mais la chose n'est pas toujours aisée lorsque l'on traite de sujets pointus. Je souhaiterais également remercier Nathalie Viguerie et Philippe Schmidely qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse.

J'adresse également mes remerciements les plus sincères aux membres de mon comité de pilotage qui m'ont encouragé et donné de précieux conseils pour avancer sur mon travail de thèse : Francis Enjalbert, Nathalie Viguerie, Nicolas Friggens sans oublier Christèle Robert-Granié, que je remercie également pour son humour, et mes longs trajets de séminaire.

Un grand merci à Rachel Rupp et Gilles Foucras, mes directeurs de thèse. Rachel, merci pour ta rigueur et tes avis précieux sur mes analyses ; tes opinions avisées m'ont toujours impressionnée. Gilles, merci pour ton sens du détail, ta réactivité dans le travail et ton enthousiasme pour la recherche ; ta passion est communicative !

Je tiens à remercier Carole Moreno et toute l'équipe Gesper parmi laquelle j'ai réalisé mon doctorat, pour les réunions amicales et dynamiques du lundi matin. Merci également à toute l'équipe Biopuces pour sa bonne humeur et la qualité des présentations. Un immense merci à Céline Noirot pour son aide indispensable en bioinformatique. Dans le désordre, je souhaiterais également remercier Charlotte Allain et Guillaume Tabouret pour toutes leurs explications.

La thèse n'aura pas révélé mon profil le plus sociable, cependant je voudrais remercier le couloir Lapins d'avoir intégré une petite brebis comme moi, qui s'était perdue lors de son CDD pré-thèse. Alors merci à Laurent pour nos parties de ping-pong endiablées, Sylvie et sa bonne humeur, Mumu pour sa gentillesse, Béa et ses conseils agronomiques, Olivier et Caro… Et puis je voudrais remercier tous mes copains et copines de thèse qui ont partagé plus ou moins longtemps ces trois ans avec moi : Christelle, sa bonne humeur et bavardages incessants, Manu pour ton amitié, Célinou, nos discussions dégoutantes et son initiation à la grossesse, Vincent pour les courses poursuites de chaises, Héloïse et ses talents culinaires, Malo pour être Malo, et tous ceux que j'oublie !

En particulier, Tehya, merci pour nos repas/poney : sandwich avalés en quelques minutes, changements de vêtements dans le froid, séance à cheval, et hop de retour à l'INRA en chantant… Mes meilleurs souvenirs de thèse !

Et à côté de la thèse… Il y en a du monde qui m'a permis de me changer les idées et de m'extraire de ma chaise…
Alors j'adresse pour commencer une ptite pensée à mes anciens colocs Adri et Luis, pour avoir vécu un an de thèse à leurs côtés : à votre amitié et tous nos repas partagés (et aux cheveux dans la douche!).

Pour suivre dans les colocs, j'en reviens à la première, merci Marine, Ma coloc, ma presque sœur, pour ton amitié toutes ces années.

Merci à ma Chacha, ma super copine, je ne saurais même plus par où commencer tellement on en a vécu des choses ensemble ! Les grosses cuisses, les clémentines au poney club, les clopes, les thés, Toirac, Gouvernes, Moliets, Toulouse… Merci pour ta présence indéfectible !

Mélane, merci pour nos discussions équines, mais surtout merci d'être toi, d'être toujours là pour moi, et de me servir si souvent de journal intime.

A tous mes amis d'école, Julia, Anne So, Caca, Charlotte, Max, Amélie, Paupau, Alicia : Merci pour nos week-ends dans toute la France, toujours dans la bonne humeur et culinairement réussi/gras (vive les figues au foie gras). Martin, merci pour nos voyages, quelles expériences inoubliables!

Merci à mes copains de Montpellier : Magou, Chacha, Gus, Flo, Loulou, Manon le héros… J'espère qu'on continuera nos petits week-ends dans le sud encore longtemps. Montpellier rime toujours avec sérénité (et manger) grâce à vous !

Quand on est cavalière et qu'on arrive à saturation, on n'a qu'une chose à faire : aller au poney ! Alors merci à mes copines équines notamment Laurie et Céline. Merci à Luc Dutoit et Gwendolen Fer pour m'avoir aidé à m'en sortir avec mon jeune cheval, le fameux Gogolito. Mine de rien, ça a participé au bon déroulement de ma thèse (oui oui !). On en revient de loin tous les deux !

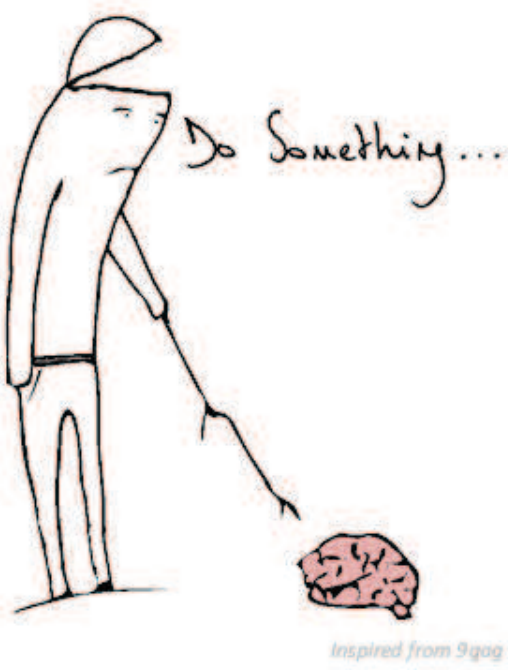
A tous ceux que j'oublie, merci !

Je voudrais adresser un immense merci à mes parents sans qui je ne serais pas là (ha ha). Merci de m'avoir toujours soutenue, gâtée, supportée, et bien élevée ! J'espère devenir une aussi bonne maman que vous avez été bons parents ! Je remercie également mes frérots qui m'ont aussi supportée, et qui deviennent de belles personnes (et personnalités). Merci à Baba et Papi Code, mes grands-parents chéris de me gâter et de m'aimer comme ils le font !

Enfin, merci à ma petite « famille » : Loulou, Mimi et surtout mon amoureux Antoine. Merci pour tes bons repas, tes petites attentions permanentes et ton soutien constant dans tout ce que j'entreprends. Pour ta sérénité et ta tendresse, qui rendent la vie si douce à tes côtés. Pour finir, je ne sais pas si je dois remercier le pois chiche pour les nausées et la fatigue en ces derniers mois de thèse, peut-être que ce sera plus facile dans quelques mois quand on le verra… Ou pas !

« Songer à un tracas, c'est le vivre deux fois »

Luc Dutoit



REMERCIEMENTS 1

SOMMAIRE 4

LISTE DES FIGURES 7

LISTE DES TABLEAUX 9

LISTE DES ABREVIATIONS 10

INTRODUCTION GENERALE 11

CONTEXTE SCIENTIFIQUE 13

I. Les mammites des ruminants laitiers 13
I.1. Présentation de la mamelle 13
I.2. Définition d'une mammite 14
I.2.1. Caractérisation clinique 14
I.2.2. Conséquences des mammites sur la qualité du lait 15
I.2.3. Conséquences économiques des mammites 16
I.2.4. Etiologie des mammites 17
I.3. Mécanismes de défense contre les infections mammaires 19
I.3.1. Défenses anatomiques 19
I.3.2. Réponse immunitaire 19
I.4. Prévention des IMIs 21
I.4.1. Optimisation de la conduite d'élevage 21
I.4.2. La vaccination 22
I.5. Infections mammaires et génétique 23
I.5.1. Paramètres génétiques 23
I.5.2. Gènes de résistance 25
I.5.3. Programmes de sélection 25
I.5.4. Lignées génétiques divergentes sur le critère CCS 27
I.6. Les méthodes curatives 30
I.7. Périodes à risque de mammites 31
II. Le bilan énergétique chez les ruminants laitiers 33
II.1. Besoins énergétiques et lactation 33
II.1.1. Synthèse du lait 33
II.1.2. Variabilité de la production et composition du lait 34
II.1.3. Besoins énergétiques pour la lactation 35
II.2. Les apports énergétiques 36
II.2.1. Glucides 36
II.2.2. Protéines 36
II.2.3. Lipides 36
II.2.4. Schéma-Bilan de l'origine des constituants du lait 37
II.3. Bilan énergétique 37
II.3.1. Mesure du bilan énergétique 37

II.3.2. Corrélations entre BE et les critères phénotypiques laitiers 39
II.4. Le péri-partum : origine du déficit énergétique 39
II.4.1. Evolution de la capacité d'ingestion 39
II.4.2. Evolution des besoins énergétiques 40
II.5. Conséquences du déficit énergétique sur le métabolisme 41
II.5.1. La lipomobilisation associée au déficit énergétique péri-partum 41
II.5.2. L'oxydation des AGNE 42
II.5.3. La cétogénèse 43
II.5.4. Synthèse des mécanismes métaboliques mis en jeu lors d'un déficit énergétique 44
II.6. Les maladies métaboliques liées au déficit énergétique 44
II.6.1. La cétose 44
II.6.2. La toxémie de gestation 45
III. Relation déficit énergétique et immunité 47
III.1. Etudes épidémiologiques du lien entre mammite et cétose, ou de leurs phénotypes associés 47
III.2. Corrélations génétiques entre un déficit énergétique et risque d'IMI 48
III.3. Conséquences d'un déficit énergétique sur la réponse inflammatoire 48
III.4. Modification du chimiotactisme des leucocytes par le déficit énergétique 49
III.5. Effets d'un déficit énergétique sur les fonctions des neutrophiles 50
III.6. Conséquences d'un déficit énergétique sur les fonctions lymphocytaires 51
III.7. Synthèse des effets possibles d'une restriction énergétique sur les fonctions immunitaires 51
ENJEUX DES TRAVAUX DE THESE 54
OBJECTIFS ET DEMARCHE EXPERIMENTALE 55
Etude 1 : Etude phénotypique des interactions entre bilan énergétique et prédisposition aux mammites au cours d'une épreuve inflammatoire 57
Etude 2 : Etude des interactions entre le déficit énergétique et la réponse inflammatoire mammaire 72
Etude 3 : Intégration des données transcriptomiques et phénotypiques et vérification des hypothèses formulées à l'échelle d'un troupeau 88
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 126
I. Intérêts et limites des stratégies expérimentales et des méthodologies appliquées 127
I.1. La brebis comme modèle expérimental ? 127
I.2. La période péri-partum ou le milieu de lactation ? 129
I.3. Le choix des brebis et la constitution des groupes expérimentaux en relation avec le bilan énergétique 129
I.4. L'épreuve inflammatoire mammaire 130
I.5. Le transcriptome sanguin comme support de l'étude des réponses locale et systémique 133
I.6. La technique RNAseq 134

I.7. L'intégration de données phénotypiques et transcriptomiques 139
II. Réflexions sur la relation entre la prédisposition aux mammites et le déficit énergétique 140
II.1. Absence d'effet direct du déficit énergétique sur la réponse inflammatoire 140
II.2. Des relations immunité/métabolisme incontestables 141
II.2.1. L'immunité et le métabolisme lipidique 141
II.2.2. Le glucose : un nutriment essentiel de la cellule immunitaire 142
II.3. Existence d'une interaction entre la prédisposition génétique aux infections mammaires et l'adaptation métabolique à un déficit énergétique 144
II.3.1. Hypothèses expliquant une prédisposition au déficit énergétique chez les brebis génétiquement prédisposées aux mammites 146
II.3.2. Le rapport TB/TP, un nouvel outil de sélection ? 150
CONCLUSION 152
BIBLIOGRAPHIE 154
PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES ET COMMUNICATIONS 165
LE RNA-SEQ POUR LES NULS 167

Figure 1 : Morphologie de la mamelle de brebis 13

Figure 2 : Etiologie des mammites subcliniques des brebis laitières 18

Figure 3 : Pondération de la sélection sur les CCS par rapport aux autres caractères sélectionnés chez les ruminants laitiers français. 26

Figure 4 : Titre bactérien des laits de brebis des lignées CCS+ et CCS- 28

Figure 5 : Cinétique du recrutement cellulaire et de la résilience bactérienne dans les lignées divergentes en scores cellulaires de brebis Lacaune lors d'une infection bactérienne. 29

Figure 6 : Répartition des réformes selon leur stade de lactation des brebis primipares élevées au domaine expérimentale de la Fage 32

Figure 7 : Synthèse et origine des constituants du lait 37

Figure 8 : Comparaison des besoins pour l'utérus (j 250 de la gestation) et la mamelle (j 4 postpartum) chez la vache de race Holstein 41

Figure 9 : La β-oxydation des acides gras 43

Figure 10 : La cétogénèse 43

Figure 11 : Conséquences d'un déficit énergétique sur le métabolisme 44

Figure 12 : Schéma expérimental 55

Figure 13 : Etude des métabolites au cours de la lactation chez les brebis Lacaune 128

Figure 14 : Concentration plasmatique de BHB chez 12 brebis CCS+ (▲) et 12 brebis CCS- (△) en déficit énergétique, et 12 brebis CCS+ (●) et 12 brebis CCS- (○) contrôles. Le jour 0 correspond au premier jour de la restriction. 130

Figure 15 : Résultats de l'analyse par cytométrie en flux des types cellulaires du sang chez les brebis en restriction énergétique (NEB) et les brebis contrôle (PEB) à trois pas de temps, relatifs à l'injection intramammaire (T0). 132

Figure 16 : Chaine de traitements bioinformatiques utilisés 136

Figure 17 : Schéma bilan du rôle de SREBP dans la lipogenèse et l'inflammation 142

Figure 18 : Schéma-Bilan montrant le contrôle de CD28 sur l'utilisation de glucose dans les lymphocytes T 143

Figure 19 : Schéma-Bilan des processus biologiques (en bleu) exacerbés chez les brebis CCS+ en réponse à la restriction énergétique et mis en évidence par l'analyse des caractères phénotypiques et des données du transcriptome sanguin (en rouge) 145

Figure 20 : Heatmap montrant les corrélations entre caractères de production avant restriction avec les concentrations en AGNE et BHB pendant la phase de restriction énergétique..... 147

Tableau 1 : Modifications de la qualité du lait en cas de mammite 16

Tableau 2 : Grille de paiement du lait de brebis dans le rayon de Roquefort 17

Tableau 3 : Caractéristiques des lignées divergentes CCS+ et CCS- de brebis Lacaune 28

Tableau 4 : Traitement antibiotique des mammites cliniques sans signes généraux en première intention 31

Tableau 5: Synthèse des constituants du lait de brebis 33

Tableau 6 : Comparaison des productions laitières des ruminants laitiers en France (2015) . 35

Tableau 7 : Besoins métaboliques de la vache pour le développement du fœtus et la synthèse du colostrum à la fin de la gestation. 40

Tableau 8 : Contribution des tissus adipeux (TA) viscéraux à la mobilisation des lipides chez la brebis en gestation 42

Tableau 9 : Conséquences d'un déficit énergétique ou d'une augmentation des concentrations en AGNE ou en corps cétoniques sur les fonctions immunitaires des leucocytes 53

Tableau 10 : Effet intradate de la restriction énergétique sur le transcriptome sanguin des échantillons prélevés à J -4 avant le changement alimentaire, à J 11 après le début de la restriction énergétique (J0) à H0, H+8 et H+24 par rapport au challenge immunitaire..... 86

Tableau 11 : Effet intradate de la restriction énergétique sur les gènes d'intérêt identifiés comme différentiels en réponse à la restriction énergétique par l'analyse réalisée sur les trois dates de prélèvement. 87

AG : Acides Gras

AGNE : Acides Gras Non Estérifiés

AGV : Acides Gras Volatils

ARNm : Acide Ribonucléique messager

BE : Bilan Energétique

BH : Benjamini-Hochberg

BHB : Bêta-Hydroxybutyrate

CCS : Concentration de Cellules Somatiques

CD : Coefficient de Détermination

CEM : Cellules Epithéliales Mammaires

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

E. Coli *: Escherichia Coli*

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IMI : Infection Intra-Mammaire

LPS : Lipopolysaccharide

LXR : Liver X Receptor

MC : Mammite Clinique

MDP : Muramyldipeptide

NEC : Note d'Etat Corporel

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell

PCR : Polymerase Chain Reaction

PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptors

QMG : Quantité de Matière Grasse

QMP : Quantité de Matière Protéique

QTL : Quantitative Trait Loci

S. aureus *: Staphylococcus aureus*

SCN : Staphylocoques à Coagulase Négative

SCS : Score de Cellules Somatiques

TB : Taux Butyreux

TLR : Toll Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TP : Taux Protéique

TR : Transcriptase Réverse

Les infections intra-mammaires (IMI), sont une cause importante de maladie, de mortalité et de pertes de production chez les ruminants laitiers. Elles entrainent des pertes économiques importantes pour les éleveurs, en raison de la diminution de production laitière, de la dévalorisation du prix de vente du lait, des traitements antibiotiques et de l'augmentation du taux de réforme. Il est donc indispensable de trouver des solutions pour diminuer la fréquence des IMIs. Différentes stratégies de prévention contre les IMIs sont ainsi développées comme l'optimisation de la conduite d'élevage, la vaccination ou l'amélioration génétique. Dans le cadre de cette dernière stratégie, de nombreux pays ont intégré dans leurs programmes de sélection en bovins et ovins laitiers la concentration de cellules somatiques dans le lait. Afin d'étudier les conséquences d'une sélection basée sur le comptage de cellules somatiques, des lignées divergentes de brebis ont été créées à l'unité expérimentale INRA de La Fage sur la base des index CCS extrêmes de leurs parents.

D'autre part, une partie de l'optimisation de la conduite d'élevage consiste à mieux comprendre et appréhender les périodes à risque des IMIs. Notamment, la période péri-partum est une période à risque d'IMIs chez les ovins et chez les bovins laitiers. Chez les bovins, le début de lactation est caractérisé par un déficit énergétique quasi-systématique menant parfois à la cétose. Dans une moindre mesure, la brebis prolifique est touchée par le déficit énergétique principalement en fin de gestation menant parfois à une toxémie de gestation. Tout comme la cétose, la toxémie de gestation provient d'un dérèglement du métabolisme du au déficit énergétique. Celui-ci entraîne en effet une augmentation de la synthèse d'Acides Gras Non Estérifiés (AGNE) en réponse à une mobilisation des triglycérides présents dans les tissus adipeux, et par conséquent une augmentation de la synthèse de corps cétoniques comme le Béta-Hydroxybutyrate (BHB). Afin d'étudier les conséquences d'un tel dérèglement métabolique, plusieurs études *in vitro* ont montré qu'une augmentation de la concentration en acides gras et/ou les corps cétoniques modifiait la réponse de certaines fonctions immunitaires. Des corrélations génétiques entre mammites et cétoses ou leurs phénotypes associés ont également été démontrées. Cependant, les mécanismes liant immunité et métabolisme restent encore peu connus dans le cadre des IMIs.

Mon travail de thèse avait pour vocation d'apporter des connaissances sur le lien ou l'interaction éventuelle entre déficit énergétique et susceptibilité aux mammites, en valorisant le modèle des lignées divergentes. Mes analyses se sont basées sur l'étude de phénotypes, du transcriptome sanguin et de la composition des acides gras du lait.

Ce manuscrit débute par un contexte scientifique et bibliographique présentant les infections intra-mammaires (IMI) et le bilan énergétique. Un état des lieux des connaissances actuelles du lien entre les IMIs et le déficit énergétique se basant sur des études génétiques, phénotypiques et mécanistiques est ensuite présenté. Le contexte scientifique est suivi d'une présentation des enjeux et objectifs de mes travaux de thèse. Les démarches expérimentales et les résultats obtenus sont ensuite présentés sous forme d'articles publiés ou rédigés pour soumission. Le manuscrit s'achève par une discussion des stratégies méthodologiques employées et des résultats obtenus.

I. Les mammites des ruminants laitiers

I.1. Présentation de la mamelle

L'anatomie de la glande mammaire varie selon les espèces. Le nombre de glandes et de trayons varient de quatre chez la vache, à seulement deux pour la brebis et la chèvre. A l'inverse, l'anatomie microscopique est très semblable chez ces animaux.

Le tissu sécrétoire, composé d'alvéoles reliées entre elles en réseau, est localisé dans la région la plus proximale de la glande. Le parenchyme est drainé par un réseau de canaux dit galactophores qui débouchent chez les ruminants dans une citerne. C'est dans cette cavité qu'est stockée une partie du lait avant d'être évacué par le canal du trayon lors de de la tétée ou de la traite. Cette citerne est proportionnellement de taille réduite chez la vache, et plus volumineuse chez la brebis ou la chèvre.

Au plan microscopique, les alvéoles sont tapissées d'une couche de cellules épithéliales mammaires (CEM) polarisées. La sécrétion lactée est libérée au pôle apical des cellules dans la lumière de l'alvéole. Le tissu entourant l'alvéole est constitué de cellules myoépithéliales contractiles, de fibroblastes, d'adipocytes et de vaisseaux lymphatiques et sanguins. La figure 1 présente l'anatomie de la mamelle de brebis.

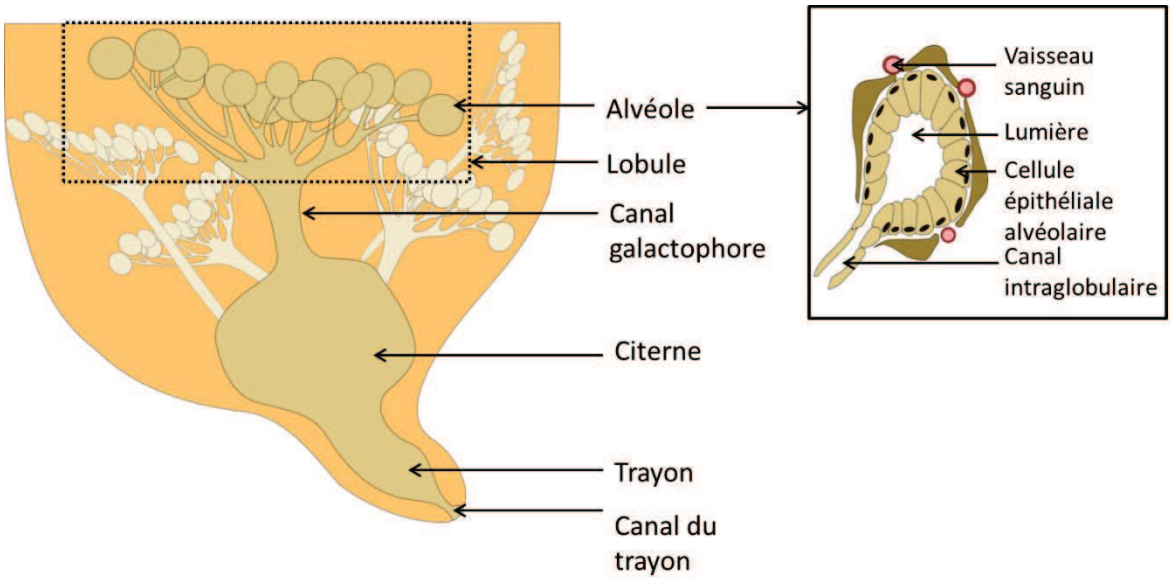


Figure 1 : Morphologie de la mamelle de brebis

Les deux glandes de la brebis sont séparées par un ligament suspenseur postérieur. Chaque hémi-mamelle possède un trayon, une innervation et des réseaux vasculaire et lymphatique indépendants.

I.2. Définition d'une mammite

Une mammite est une inflammation de la glande mammaire le plus souvent à la suite de la colonisation par un agent infectieux, qui est généralement ascendante à travers le canal du trayon d'une hémi-mamelle. Les infections intra-mammaires (IMI), sont une cause importante de maladie, de mortalité et de pertes de production chez les ruminants élevés pour la production laitière. Elles représentent la deuxième cause de réforme en élevage ovin laitier, après l'insuffisance de production laitière, avec une proportion d'environ 20% (source SIOL-CNBL, project CASDAR RUSTIC).

I.2.1. Caractérisation clinique

Selon la sévérité, on différencie la mammite clinique qui entraine une modification systématique de l'aspect de la mamelle (rougeur/chaleur/congestion), de celui du lait (liquide séro-hémorragique), et de l'état clinique de l'animal (abattement, fièvre), de la mammite subclinique qui est imperceptible par l'observateur.

Les mammites subcliniques, mises en évidence grâce à une analyse bactériologique du lait, n'entrainent en effet aucun changement macroscopique du lait et se manifestent par une concentration en cellules somatiques (CCS) du lait élevée chez les animaux affectés. Les mammites subcliniques sont prépondérantes dans les élevages ovins, avec une prévalence moyenne comprise entre 20 et 30% (Bergonier, D. et al., 1997).

Contrairement à la vache laitière chez qui la prévalence annuelle est d'environ 20%, les mammites cliniques sont plutôt rares dans les élevages ovins avec une prévalence inférieure à 5% (Bergonier et al., 2003). La mammite clinique peut être qualifiée en fonction de l'intensité des signes cliniques comme étant bénigne (sécrétions modifiées sans inflammation locale), modérée (sécrétions lactées modifiées avec inflammation locale), ou sévère si en plus des signes locaux, des signes généraux sont présents. Il arrive que l'incidence des mammites cliniques atteigne 30 à 40% dans certains troupeaux ovins. Dans ce cas, elle est généralement liée à une contamination environnementale ou à des pratiques d'hygiène médiocres.

Parfois les germes s'installent de façon durable dans la glande mammaire, on parle alors de mammite chronique. Les mammites chroniques se manifestent chez les petits ruminants par la présence de lésions comme les abcès mammaires qui peuvent être observés relativement facilement compte tenu du moindre volume de la mamelle et de la facilité de la palpation (Bergonier, D. et al., 1997). Elles sont notamment caractérisées par le déséquilibre de la mamelle à cause d'une diminution du volume de la glande atteinte, la présence d'une induration liée à la fibrose et l'hypertrophie des nœuds lymphatiques.

I.2.2. Conséquences des mammites sur la qualité du lait

Les processus inflammatoires liés aux mammites entrainent un recrutement cellulaire, donc une augmentation de la concentration en cellules somatiques (CCS) du lait. En absence d'IMI, les valeurs des CCS sont faibles et généralement inférieures à 100 000 voire 50 000 cellules/mL de lait chez les ruminants laitiers. L'intensité de la réponse cellulaire est très variable selon l'agent pathogène impliqué et les capacités de défense de l'animal. Dans certains cas de mammites cliniques, les CCS peuvent atteindre plusieurs millions de cellules par mL (Pyörälä and Pyörälä, 1997).

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

De plus, lorsqu'elle est marquée et persistante, l'inflammation mammaire provoque une atrophie fibreuse de la glande à l'origine d'une perte fonctionnelle et d'une diminution de la production laitière de l'animal de l'ordre de 10 à 15% en moyenne. Cette diminution pourrait également être liée à la diminution de synthèse du lactose, des transporteurs du glucose et des acides gras (Ogola et al., 2007).

Les IMIs sont également responsables d'une augmentation de la concentration en protéines solubles en raison de l'augmentation de la perméabilité hémato-mammaire. Les concentrations en sérumalbumine et immunoglobulines sont ainsi augmentées en réponse à l'inflammation. Elles sont associées à une diminution de la concentration en matières grasses qui s'accompagne d'une augmentation de la teneur en acides gras libres (Tableau 1) pouvant s'expliquer par une augmentation de la quantité de lipases provenant des leucocytes apoptotiques dans le lait.

La composition du lait en minéraux est également modifiée lors d'une IMI. En effet, les teneurs en potassium, calcium et phosphore diminuent ce qui pourrait s'expliquer par une

diminution des constituants auxquels ils sont complexés, comme la caséine dans le cas du calcium et du phosphore (Ogola et al., 2007).

Tableau 1 : Modifications de la qualité du lait en cas de mammite

Qualité du lait	Variation
Lactose	↘
Protéines solubles	= ou ↗
α-Lactalbumines	=
β-Lactoglobulines	=
Sérumalbumines	↗
Immunoglobulines	↗
Caséines totales	↘
α-S1	↘
β	↘
k	=
Rapport caséines/MP totales	↘
Lipides totaux	= ou ↘
Acides gras libres	↗
Matières minérales	↗

I.2.3. Conséquences économiques des mammites

Comme vu précédemment, les mammites sont préjudiciables à la quantité et à la qualité du lait, et génèrent des conséquences néfastes sur la rentabilité d'un atelier de production laitière et sur l'économie de cette filière. Les mammites peuvent également entrainer la mortalité des brebis, surtout en début de lactation et d'une diminution du gain de poids des agneaux, voire d'une mortalité des agneaux en élevage ovin allaitant. Des données récentes suggèrent également que la survenue des mammites interfère avec la capacité de reproduction de la vache laitière (Albaaj et al., 2017).

De plus, la qualité cellulaire du lait est un des critères permettant de déterminer le prix de vente du lait. En effet, des mesures de CCS de tank sont réalisées à intervalles réguliers (tous les mois environ) et le prix payé au producteur est fonction de la concentration mesurée ; des

pénalités sont appliquées si les valeurs de CCS dépassent certains seuils. Le tableau 2 présente la grille de paiement du lait de brebis dans le Rayon de Roquefort en 2015 :

Tableau 2 : Grille de paiement du lait de brebis dans le rayon de Roquefort (Confédération Générale de Roquefort, campagne 2015)

	Moyenne arithmétique des résultats du mois (en cellules par mL)	Incidence sur le prix (en euros par 1000 L)
A	≤ 500 000	0
B	500 000 à 800 000	0
C	0,8 à 1,1 million	- 30,50
D	> 1,1 million	- 68,60

Les pénalités sur le prix de vente du lait, mais aussi le coût des traitements et le gaspillage de lait impropre à la consommation impactent davantage l'économie de la filière que les pertes de production elles-mêmes. De manière générale, une étude française a montré que la perte économique due aux mammites (fréquence des mammites cliniques et CCS élevées) sur 197 troupeaux était de 78 € par vache par année, ou 11 € par 1000 L de lait (Seegers et al., 2003). Cette étude est en accord avec une étude américaine réalisée sur 5 exploitations montrant que le coût moyen des mammites cliniques était de 71 $ par vache par année (Bar et al., 2008). Chez les petits ruminants, le coût total de la perte de production liée aux mammites peut être estimé à environ 60 millions d'euros dans l'Union Européenne (Rupp and Foucras, 2010).

I.2.4. Etiologie des mammites

Les IMIs sont principalement d'origine bactérienne, et parfois d'origine lentivirale chez la brebis. Les bactéries causant la mammite peuvent être classées en fonction des modalités épidémiologiques de contamination. On distingue ainsi les infections qui évoluent selon un mode contagieux et celles dont les sources sont environnementales. Les bactéries contagieuses sont essentiellement transmises d'un animal à l'autre (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*) car leur réservoir se situe préférentiellement dans la mamelle et sur la peau des trayons.

Les bactéries environnementales (dont l'exemple le mieux connu est *Escherichia Coli*) sont le plus souvent des entérobactéries et sont présentes dans les aires de vie des animaux comme le sol ou la litière. A l'échelle du troupeau, lorsque les bactéries contagieuses sont présentes chez des femelles infectées en lactation, elles causent généralement des mammites

subcliniques. En revanche, les bactéries environnementales se manifestent plus souvent par des mammites cliniques.

Chez la brebis, les IMIs d'origine bactérienne sont majoritairement provoquées par des staphylocoques coagulase-négatifs (SCN, figure 2). Les SCN les plus fréquemment isolés sont *S. epidermis* puis *S. xylosus*, *S. chromogenes* et *S. simulans*, et sont principalement responsables de mammites subcliniques. En revanche, *S. aureus* est la bactérie la plus fréquemment isolée lors de mammites cliniques (20 à 60%) d'après Mørk et al. (2007), surtout dans la période post-partum (<1 mois de lactation).

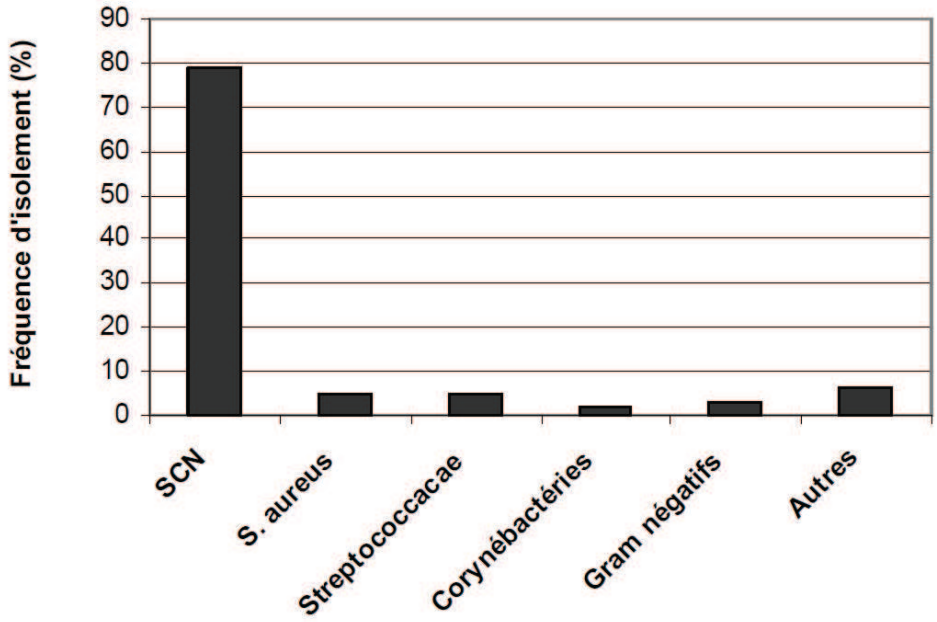


Figure 2 : Etiologie des mammites subcliniques des brebis laitières (Bergonier, 2006)

Chez la vache, les streptocoques sont également identifiés à l'occasion de mammites cliniques ou subcliniques. Les résultats des analyses bactériologiques réalisées sur des échantillons de lait prélevés à l'occasion d'une mammite dans des élevages français de la région Rhône-Alpes entre 2007 et 2008, ont montré que *Streptococcus uberis* (22,1% des isolats), puis *Escherichia coli* (16%) et les staphylocoques coagulase positifs (*S. aureus* ou *hyicus*) (15,8%) étaient les pathogènes majeurs identifiés responsables des mammites cliniques, alors que les staphylocoques coagulase-positifs (30,2%), les SCN (13,7%), et *Streptococcus dysgalactiae* (9,3%) étaient identifiés majoritairement lors de mammite subclinique (Botrel et al., 2010).

I.3. Mécanismes de défense contre les infections mammaires

I.3.1. Défenses anatomiques

L'anatomie de la mamelle constitue la première ligne de défense contre les agents pathogènes mammaires. La morphologie du trayon représente une première barrière efficace de la mamelle. En effet, l'extrémité du canal du trayon possède un sphincter qui permet une fermeture de l'orifice entre les traites. De plus, un bouchon de kératine se forme quelques jours après l'arrêt de la traite en fin de lactation, à l'extrémité inférieure du canal du trayon et permet une étanchéité plus ou moins totale au bout d'une semaine environ (Paulrud, 2005). En outre, la compartimentation de la mamelle permet de limiter la propagation de l'agent pathogène d'une glande à l'autre.

De plus, 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 (Goff and Horst, 1997). Les AG estérifiés et non estérifiés (linoléique, palmitoléique) associés à la kératine ont également une activité bactériostatique (Oviedo-Boyso et al., 2007).

I.3.2. Réponse immunitaire

- La réponse inflammatoire

D'un point de vue macroscopique, l'inflammation se traduit par la rougeur et la chaleur associée à la tuméfaction et à la douleur. Sur le plan clinique, ces signes permettent une reconnaissance aisée de l'inflammation aigüe des tissus superficiels.

D'un point de vue microscopique, l'inflammation débute dès la reconnaissance des signaux produits par les agents infectieux par les cellules portant des récepteurs PRR (Pathogen Recognition Receptors). Les cellules épithéliales mammaires, numériquement les plus abondantes, expriment certains récepteurs et sont susceptibles de jouer le rôle de sentinelles. Cependant lorsque ces cellules épithéliales sont stimulées *in vitro* avec des agonistes bactériens ou avec des bactéries entières et vivantes, la libération de médiateurs inflammatoires reste faible. Par ailleurs, des cellules spécialisées comme les macrophages ou les cellules dendritiques localisées en région sous-épithéliale peuvent surveiller les modifications du milieu du côté luminal grâce à des prolongements cytoplasmiques (Maxymiv et al., 2012). Ces cellules sont donc à même de détecter les agents étrangers et initier la réponse inflammatoire et immunitaire.

Une fois les agents pathogènes reconnus, la libération de médiateurs et de cytokines inflammatoires initie la cascade inflammatoire qui conduit à la modification des échanges moléculaires et cellulaires à travers la barrière endothéliale.

- La réponse immunitaire

Les cellules somatiques présentes dans le lait d'une glande mammaire saine sont principalement des cellules mononucléées comme des lymphocytes et des monocytes/macrophages, alors que le lait d'une glande infectée contient majoritairement des neutrophiles (Rivas et al., 2001).

De manière générale, la migration des leucocytes vers les tissus infectés et le lait est possible grâce à i) la sécrétion de cytokines (dont les interleukines), de chimiokines et des éicosanoïdes (prostaglandines, leucotriènes) pro-inflammatoires et ii) l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales qui permettent l'adhésion des leucocytes à la paroi vasculaire. L'interaction entre les leucocytes et l'endothélium est ainsi un processus déterminant en partie l'efficacité de la réponse cellulaire lors d'une maladie infectieuse. Lorsque la source de l'inflammation est éliminée, l'expression des molécules d'adhésion est réduite et la production de médiateurs anti-inflammatoires initie la phase de régulation.

Traditionnellement, on distingue la réponse immunitaire innée qui constitue la première réponse de défense de l'hôte contre des organismes étrangers, de la réponse adaptative qui confère une protection plus tardive mais plus durable.

Les cellules associées à la réponse immunitaire innée telles que les neutrophiles et les macrophages sont essentielles pour éradiquer les agents pathogènes. En effet, ces cellules sont recrutées du secteur vasculaire jusqu'au site de l'infection et phagocytent les particules infectieuses. L'efflux primaire de neutrophiles est indispensable ; on considère que la rapidité de ce recrutement est essentiel en cas de mammites à *E. Coli* par exemple, un germe dont la multiplication dans le lait est rapide. Le recrutement des neutrophiles dans le parenchyme mammaire est permis par des chimiokines comme CXCL-1 et CXCL-8 (IL-8) (Paape et al., 2003) ou par des cytokines pro-inflammatoire comme le TNF-α et l'IL-1β, qui stimulent en outre l'activité bactéricide des neutrophiles (Oviedo-Boyso et al., 2007).

Pour la réponse adaptative, les cellules B différenciées en plasmocytes produisent des anticorps permettant d'augmenter la phagocytose par opsonisation des bactéries. De plus, les anticorps se fixent sur les bactéries, et réduisent ainsi leur adhérence aux cellules épithéliales mammaires.

Cette étape ne semble toutefois pas être essentielle pour limiter la prolifération des bactéries responsables d'IMIs, contrairement aux bactéries induisant des infections intestinales. Les anticorps peuvent également provoquer la lyse directe des bactéries avec l'aide du complément.

En revanche, le rôle des cellules T dans le contexte des infections mammaires reste peu connu. Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) jouent un rôle essentiel dans l'initiation et la régulation de la réponse immunitaire adaptative. En particulier, les molécules du CMH de classe I sont exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées et interagissent avec les lymphocytes cytotoxiques T CD8+. Les molécules du CMH de classe II sont impliquées dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T auxiliaires (CD4+) qui sont essentiels à la régulation des autres réponses cellulaires (B et CD8+).

I.4. Prévention des IMIs

Les défenses intrinsèques de la mamelle ne sont cependant pas suffisantes pour prévenir l'apparition des mammites.

Deux catégories de mesures préventives contre les IMIs peuvent être adoptées pour réduire leur fréquence chez les ruminants laitiers :

- des mesures permettant de réduire la pression infectieuse (optimisation de la conduite d'élevage)
- des mesures permettant d'augmenter la résistance des animaux (vaccination et amélioration génétique)

L'amélioration génétique est donc une approche complémentaire permettant de contrôler l'incidence des mammites. Son avantage réside dans le fait que, bien que plus longue à mettre en œuvre à l'échelle d'une population, ses effets sont durables. Cette approche sera décrite dans le prochain paragraphe.

I.4.1. Optimisation de la conduite d'élevage

L'optimisation de la conduite d'élevage peut contribuer, grâce à l'amélioration des conditions d'hygiène, à diminuer l'exposition mammaire aux germes dont le réservoir est environnemental (bâtiment, litière,…). Notamment, il est conseillé (Sutra and Poutrel, 1994) :

- de nettoyer et d'essuyer les trayons avant la traite, avec une serviette humide différente pour chaque animal

- de tremper les trayons de préférence par pulvérisation avec une solution désinfectante après la traite
- d'utiliser des gants qui doivent être changés toutes les 20 à 30 min
- de nettoyer et désinfecter les installations de traite et la salle de traite après chaque traite

Ces mesures sont cependant difficilement réalisables en élevage de petits ruminants au vu des effectifs importants et du temps de travail à y consacrer. Aussi, elles sont rarement mises en œuvre.

Il est également important de vérifier les réglages (dépression, fréquence de pulsation) de la machine à traire et d'entretenir régulièrement celle-ci (notamment des équipements en caoutchouc). De plus, Bartlett et al. (1992) ont montré que le fait d'alimenter les vaches juste après la traite était une méthode utile pour retarder le couchage, et permettre ainsi au sphincter du trayon de se refermer, avant contact avec la litière éventuellement souillée. Enfin, il est maintenant courant d'utiliser un obturateur du trayon pendant la période sèche afin de réduire les infections durant cette période et ainsi diminuer la fréquence des mammites en début de lactation.

De manière plus générale, l'élimination des animaux atteints de mammite chronique provoquée par un germe contagieux est une pratique courante pour maintenir l'état sanitaire global du troupeau, sans avoir recours au traitement dont l'efficacité est globalement faible lors d'infection chronique.

I.4.2. La vaccination

Depuis quelques années, des efforts ont été réalisés pour développer des vaccins contre les agents responsables des mammites. La vaccination a pour objectif de protéger l'animal en stimulant l'immunité adaptative vis-à-vis de certains germes : diminuer la sévérité des signes cliniques, réduire le nombre de cas et prévenir l'augmentation des CCS. En France, un seul vaccin dispose d'une autorisation de mise sur le marché : le vaccin Starvac® pour les bovins et Vimco® pour les petits ruminants du laboratoire Hipra. Ces vaccins contiennent la valence *S. aureus* ; elle est complétée d'une souche d'*E. coli* pour le vaccin bovin. La souche d'*E. coli* possède un lipopolyoside (LPS) de membrane incomplet, elle apporte donc des antigènes communs aux souches d'*E. coli* mais également aux autres entérobactéries (*Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, etc…). La souche de *S. aureus* comprend un polyoside capsulaire de type 8 et produit un composant extracellulaire pseudocapsulaire dit «slime», antigène commun aux souches de *S. aureus* et aux staphylocoques coagulase-négatifs.

Diverses études ont été réalisées afin de tester l'efficacité d'un tel vaccin. D'après Schukken et al. (2014), l'efficacité du vaccin contre *S. aureus* dépend des caractéristiques de l'élevage et de la conduite de celui-ci. Il semblerait toutefois que la vaccination n'ait pas limité complètement le risque d'infection, mais diminué la durée de l'IMI et le risque de transmission de l'infection. Une étude récente montre également que la chute de production et l'augmentation de la CCS et de la concentration des neutrophiles en réponse à une inoculation avec *S. aureus* était plus faible chez les vaches vaccinées que chez les vaches non-vaccinées (Piepers et al., 2017).

I.5. Infections mammaires et génétique

Le caractère de résistance, au sens large, peut être défini comme la capacité des animaux à prévenir activement la croissance des agents pathogènes dans l'organisme. Deux types de mesures peuvent être réalisés afin de caractériser la résistance d'un animal à une maladie :

- des mesures directes, correspondant au diagnostic des infections (statut bactériologique, enregistrement des mammites cliniques)
- des mesures indirectes, correspondant au dépistage des infections à l'aide de critères traduisant l'intensité de la réaction de défense de l'organisme (CCS)

Ainsi, les mesures indirectes n'orientent pas nécessairement vers les mêmes caractéristiques de la résistance que les mesures directes. Ces dernières mesurent en effet la résistance réelle alors que les mesures indirectes mesurent des paramètres liés à l'inflammation.

I.5.1. Paramètres génétiques

L'estimation de paramètres génétiques permet de quantifier la part génétique de la résistance et de choisir les objectifs et critères de sélection.

L'héritabilité (h^2) est la proportion de la variance totale (V_P) due à des causes génétiques, et qui est transmissible : $h^2 = V_A/V_P$ où V_A est la part de variance génétique additive (qui exclut la part génétique de dominance ou d'épistasie entre les gènes).

La corrélation génétique est la mesure du degré de relation génétique entre deux ou plusieurs caractères chez les mêmes individus :

$$r = \frac{cov\ (a, b)}{\sqrt{var(a)var(b))}}$$

De manière générale, les variables de quantité liées à la production laitière (lait, quantité de matière protéique=QMP, quantité de matière grasse=QMG) présentent une héritabilité proche

de 25% ; les taux protéique et butyreux sont plus héritables (~50%) (Barillet and Bonaïti, 1992).

Les caractères liés à la résistance aux mammites ont en revanche des valeurs d'héritabilité assez faibles :

- **Bactériologie du lait**

L'héritabilité du statut bactériologique de la mamelle est estimée entre 0,02 et 0,04 chez les bovins laitiers (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. De plus, très peu de données sont disponibles afin d'estimer ce caractère.

- **Mammites cliniques**

La fréquence des mammites cliniques étant seulement de 5% chez les ovins laitiers et les caprins, aucun paramètre génétique n'a pu être calculé. Cependant, les mammites cliniques sont un problème assez fréquent chez les bovins laitiers et l'héritabilité de ce caractère a pu être calculé : elle est comprise entre 0,02 et 0,04 (Rupp and Boichard, 2003)**.**

- **CCS**

Les paramètres génétiques ne sont pas calculés directement à l'aide de la CCS, mais à partir du score de cellules somatiques (SCS), qui est calculé à partir d'une transformation logarithmique de la CCS (Shook, 2006) permettant de normaliser la distribution des données :

$$SCS = 3 + log2(\frac{CCS}{100000})$$

Les estimations de l'héritabilité des SCS en France sont de 0,15 en moyenne chez les bovins laitiers (Rupp and Boichard, 2003), entre 0,11 et 0,14 chez les ovins laitiers (Rupp et al., 2003), et entre 0,20 et 0,24 chez les caprins laitiers (Rupp et al., 2011), avec des estimations proches de celles de la littérature internationale (Rupp and Foucras, 2010).

En revanche, la corrélation génétique entre les SCS et l'infection bactérienne est proche de 1 chez la vache (Weller et al., 1992). Le SCS est ainsi fortement corrélé à la mammite subclinique. La corrélation génétique entre les SCS et les mammites cliniques est plus faible, et estimée à 0,30 à 0,80 selon les auteurs (Rupp and Foucras, 2010), suggérant qu'il ne s'agit pas exactement des mêmes caractères.

I.5.2. Gènes de résistance

Les avancées récentes dans le séquençage du génome des ruminants domestiques a ouvert de nouveaux horizons de recherche pour l'amélioration génétique de ces espèces (International Sheep Genomics Consortium et al., 2010, Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium et al., 2009). Notamment, le développement de la recherche de variants génétiques ponctuels (ou single nucleotide polymorphism, SNP) a permis d'identifier des régions du génome associées à la production laitière ou à des caractères liés à la santé. A l'heure actuelle, deux QTL ont été décrits comme associés à la prédisposition aux mammites. Sugimoto et al. (2006) ont montré qu'un polymorphisme du gène FEZL se trouvait dans une région de QTL pour le SCS chez les bovins, et était associé à des différences de concentrations en cellules somatiques. Les animaux avec une forte CCS présentaient donc une faible production de FEZL et en conséquence une diminution de production de cytokines dont TNF-alpha et IL-8. Chez les ovins, Rupp et al. (2015) ont montré qu'un polymorphisme du gène *SOCS2* se trouvait dans une région de QTL pour le SCS. La fréquence du SNP associé à une forte SCS était de 21,7% et le génotype *SOCS2* expliquait 12% de la variance du caractère. L'étude montre que la mutation est responsable de la perte de fonction de SOCS2 et pourrait expliquer une diminution de l'efficacité immunitaire de l'hôte.

L'expression de plusieurs gènes pourrait ainsi expliquer une différence de sensibilité aux mammites des ruminants, c'est pourquoi on considère la résistance aux mammites comme un caractère polygénique.

I.5.3. Programmes de sélection

Des programmes d'amélioration génétique de la résistance aux mammites sont appliqués dans de nombreux pays. 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 sur ce caractère pour les taureaux des races laitières. Les index sont définis sur la généalogie et les mesures phénotypiques de 200 filles environ, d'où la précision des index malgré la faible héritabilité des MC (Heringstad et al., 2000). Chez les bovins laitiers français, la généralisation de l'enregistrement des MC est récente et ce caractère n'est utilisé en sélection que depuis 2010. Mais jusqu'à présent la précision de cet index n'était pas très élevée. La fréquence des MC étant très faible (5%) chez les ovins laitiers et les caprins, aucun index sur les MC n'est disponible.

Comme nous l'avons vu précédemment, la CCS est un critère indirect, mais héritable, et fortement corrélé aux mammites cliniques et subcliniques. De plus, c'est un critère disponible à grande échelle et à faible coût (Rupp and Boichard, 2003). 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. Le critère a été introduit dans les objectifs de sélection bovins, ovins et caprins, respectivement en 1997, 2005 et 2016. La pondération de ce caractère par rapport aux autres critères d'intérêt sélectionnés est variable suivant l'espèce et la race (cf figure 3).

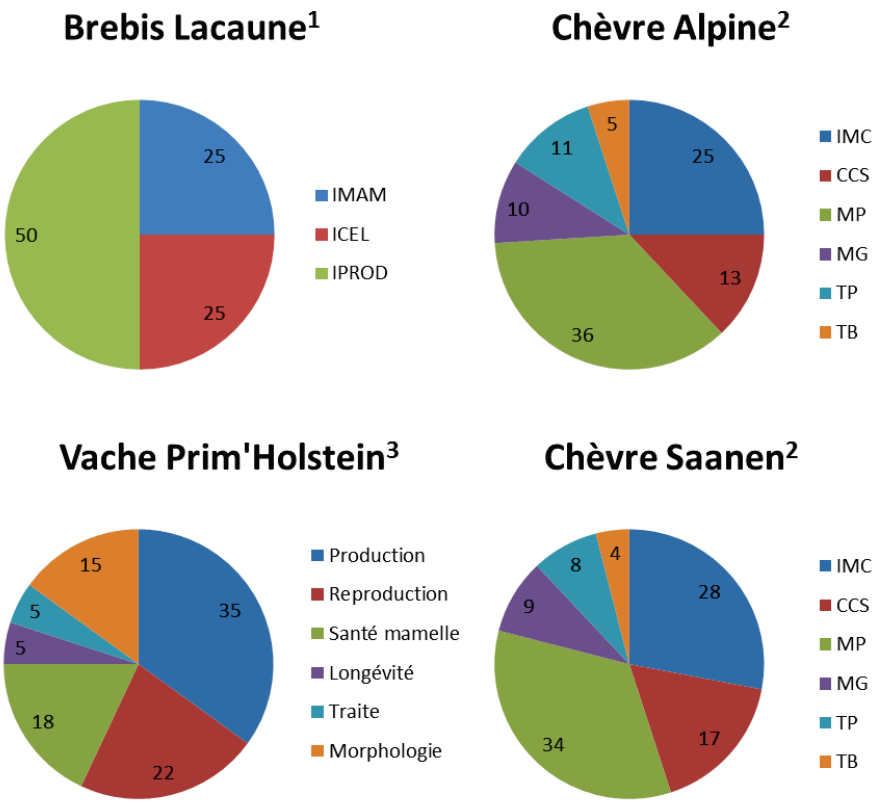


Figure 3 : Pondération de la sélection sur les CCS par rapport aux autres caractères sélectionnés chez les ruminants laitiers français (en 2017).

[1] ICEL=CCS ; IMAM=index morphologique mamelle ; IPROD=index production (lait+TB+TP)

[2] IMC= index morphologique mamelle

[3] Santé mamelle : 40% CCS, 60% mammites cliniques

I.5.4. Lignées génétiques divergentes sur le critère CCS

Dans l'objectif d'étudier les conséquences d'une sélection basée sur le score des cellules somatiques du lait, des lignées divergentes de brebis ont été créées à l'unité expérimentale (UE) INRA de La Fage sur la base des index CCS de leurs parents (Rupp et al., 2009). La brebis a été utilisée comme animal-modèle et animal-cible pour des raisons pratiques, statistiques et matérielles, les schémas de sélection étant basés sur les mêmes principes chez les espèces bovine et ovine. De plus, 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. Le dispositif animal était basé sur une sélection divergente de brebis laitières de race Lacaune. Deux groupes de béliers présentant des index CCS extrêmes, testés sur descendance ont été utilisés.

Les brebis du troupeau de l'UE La Fage ont été inséminées avec la semence de ces mâles pour produire deux groupes de brebis aux index cellulaires respectivement élevés (Lignée CCS-) et faibles (négatifs) (Lignée CCS+). Les béliers choisis présentaient un index suffisamment précis. En effet, le coefficient de détermination (CD) qui correspond à l'indice de fiabilité de l'index était en moyenne de 0,80 pour les béliers choisis. De plus, le choix s'est porté sur des béliers homogènes en termes d'index pour la production laitière.
Les lignées ont ensuite été caractérisées en fonction de leur réponse aux infections naturelles et aux infections expérimentales :

- **Infections naturelles**

Le suivi des brebis CCS+ et CCS- durant 5 ans a montré que la sélection sur les CCS était favorable à la résistance aux IMI spontanées (Tableau 3). En effet, même si peu de cas de MC sont survenus, la plupart sont apparus chez les brebis CCS+ (fréquence globale de 8%). 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 montraient également que la prévalence des IMI est plus élevée chez les brebis CCS+ que chez les brebis CCS-.

Tableau 3 : Caractéristiques des lignées divergentes CCS+ et CCS- de brebis Lacaune (Allain, C. et al., 2010)

Trait	Lignée CCS+	Lignée CCS-
CCS (*1000 c/ml) (Lactations1-3, 2005-2009)	1209 (±2955)	279 (±1289)
SCS (Lactations1-3, 2005-2009)	4,4 (±2,4)	2,6 (±1,7)
Mammites cliniques (% lactations, 2005-2009)	8	2
Abcès mammaires (% lactations, 2005-2009)	36	9
Analyses bactériologiques (% positives, 2005-2006)	46	23

La sélection divergente sur les CCS est équivalente à environ 30 ans de sélection suivant l'objectif de sélection des ovins laitiers proposé pour la race Lacaune en 2006. Ces observations ont été confirmées ultérieurement (2008-2014), grâce à une analyse des échantillons de lait par PCR quantitative montrant que la charge bactérienne était supérieure dans la lignée CCS+ comparée à la lignée CCS- (Figure 4).

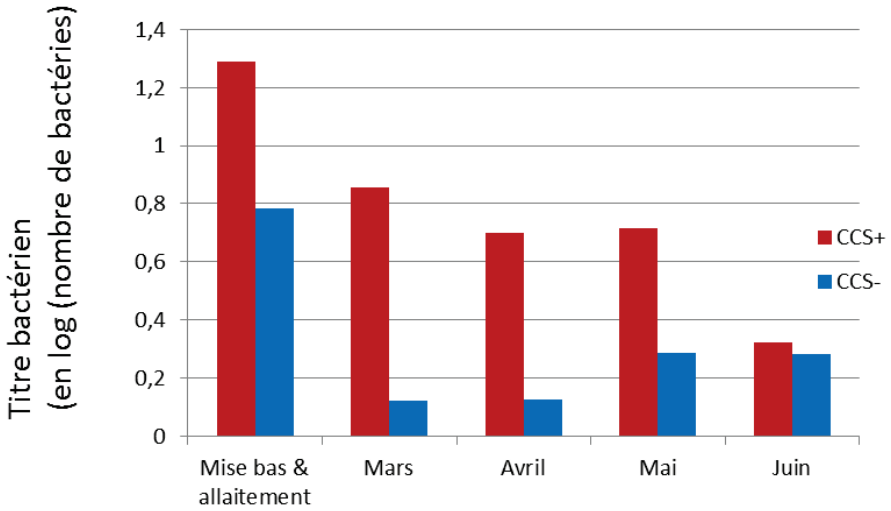


Figure 4 : Titre bactérien des laits de brebis des lignées CCS+ et CCS- (4228 analyses de lait, année 2008 à 2014)

En conclusion, ces expériences ont confirmé le fait que les brebis sélectionnées pour des CCS élevées sont plus sensibles aux infections mammaires que les brebis sélectionnées pour des CCS faibles.

- **Infections expérimentales**

Pour caractériser les différences de réponse aux IMI des brebis CCS+ et CCS-, des infections expérimentales ont été réalisées dans une unité d'infectiologie animale (UMR IHAP, ENVT). Ces expériences ont été réalisées dans des conditions contrôlées d'infection (agent pathogène, quantité inoculée, début de l'infection) permettant ainsi d'évaluer une réponse précise des brebis CCS+ et CCS- (Bonnefont et al., 2011, Bonnefont et al., 2012).

Les brebis ont été inoculées expérimentalement par *S. epidermidis* au début de leur première lactation, puis par *S. aureus* en seconde lactation. Ces deux staphylocoques sont les principaux agents responsables de mammites et sont plutôt associés respectivement à des mammites subcliniques et cliniques.

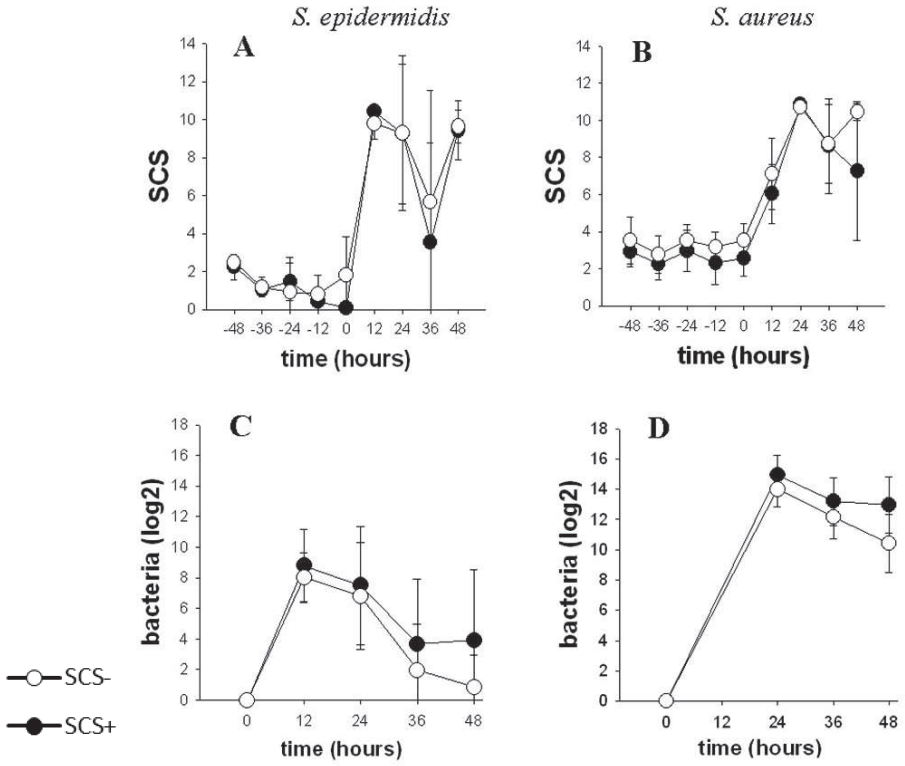


Figure 5 : Cinétique du recrutement cellulaire et de la résilience bactérienne dans les lignées divergentes en scores cellulaires de brebis Lacaune lors d'une infection bactérienne (Bonnefont et al., 2011).

Lors de ces expériences, les brebis CCS- ont bien montré une CCS plus basse que les CCS+ avant l'infection. Bien que l'inoculation ait entrainé un recrutement similaire des cellules dans le lait chez les deux lignées, le contrôle de la multiplication bactérienne en revanche, a semblé plus efficace dans la lignée CCS- que dans la lignée CCS+ (figure 5). Les brebis CCS- pourraient donc avoir des aptitudes leur permettant de limiter la multiplication bactérienne en cas d'IMI.

Les analyses du transcriptome des cellules du lait, des cellules dendritiques ainsi que les cellules épithéliales mammaires des brebis de la sélection divergente ont aussi montré que la migration des cellules immunitaires et les processus inflammatoires se traduisaient par des activations de voies différentes chez les brebis des deux lignées divergentes. En particulier, trois facteurs de transcription (RARα, TP53 et AHR) étaient associés aux différences entre les brebis de la lignée résistante et de la lignée sensible (Bonnefont et al., 2011). De plus, l'implication de certains gènes surexprimés chez les brebis de la lignée résistante suggérait fortement que l'apoptose, la prolifération cellulaire ainsi que la granulopoièse étaient favorisées chez les brebis de la lignée résistante (Bonnefont et al., 2011). Chez les cellules dendritiques, les principales voies qui différenciaient les lignées étaient la voie de signalisation de l'IL17 et des récepteurs des cellules B, la voie de signalisation des intégrines et la voie de signalisation du système du complément (Toufeer et al., 2011). Enfin, la différence modeste des profils d'expression des cellules épithéliales entre les deux lignées suggérait un rôle secondaire de ce type cellulaire dans la sensibilité/résistance génétique (Bonnefont et al., 2012).

I.6. Les méthodes curatives

En cas d'IMI, les traitements reposent essentiellement sur l'utilisation d'antibiotiques. Selon la sévérité des symptômes, ils sont appliqués soit localement par voie intra-mammaire le plus souvent, soit par voie systémique. Lorsque les symptômes font craindre une septicémie ou que la diffusion des antibiotiques est insuffisante s'ils sont appliqués par voie locale, la voie systémique est utilisée. Le choix des antibiotiques se fait sur la base du modèle épidémiologique et des bactéries suspectées, en plus de leurs propriétés (Tableau 4).

Comme vu précédemment, *Staphylococcus aureus* est le principal agent responsable des mammites cliniques ovines que ce soit en élevage allaitant ou laitier. Les antibiotiques de choix sont les bétalactamines dont la pénicilline, l'ampicilline et éventuellement des céphalosporines de première génération comme la céfalexine. Cependant, de telles mammites sont rarement traitées en raison de leur sévérité.

Tableau 4 : Traitement antibiotique des mammites cliniques sans signes généraux en première intention (Bosquet, G. et al., 2013)

Modèle épidémiologique	Mixte, indéterminé	Environnemental		Contagieux	
		> 20 % de Gram -	< 20 % de Gram -	< 20 % de SCP+	> 20 % de SCP +
Spectre d'activité	Large Gram + et Gram -		Restreint Streptocoques et SCP -		Gram + (Streptocoques, SCP + et SCP -)
Voie d'administration	Diathélique (+ générale si congestion, ancienneté)				
Choix des antibiotiques par voie diathélique	β-lactamine – aminoside, amoxicilline – acide clavulanique, bacitracine – néomycine		β-lactamines (benzylpénicilline, Pénéthamate)		Pénicilline M, Céphalosporines de 1ère et 2ème génération, Lincosamides
Choix des antibiotiques par voie générale	Macrolides, β-lactamines (pénéthamate)		β-lactamines (pénéthamate)		Macrolides

I.7. Périodes à risque de mammites

La glande mammaire est particulièrement sensible aux nouvelles infections en période péri partum et en fin de lactation. En fin de lactation, l'arrêt de la traite et la suppression des mesures d'hygiène permettent aux bactéries qui sont présentes à la surface des trayons de se multiplier et de coloniser la lumière du trayon sans être éliminées. De plus, l'accumulation possible de lait en raison de l'interruption de la traite génère un milieu très favorable à la multiplication des germes.

Le péri-partum est défini comme la période comprise entre les deux à trois dernières semaines de la gestation et les deux à trois premières semaines de la lactation. De manière générale, cette période est donc associée à une augmentation des IMIs et des mammites chez les ruminants laitiers, bien que peu de données sont disponibles chez les brebis. La figure 6 nous montre la répartition des réformes chez 2412 brebis primipares élevées entre 2005 et 2016 au domaine expérimental de La Fage selon leur stade de lactation, et permet toutefois de confirmer que les réformes dues aux mammites cliniques sont les plus fréquentes en début de lactation.

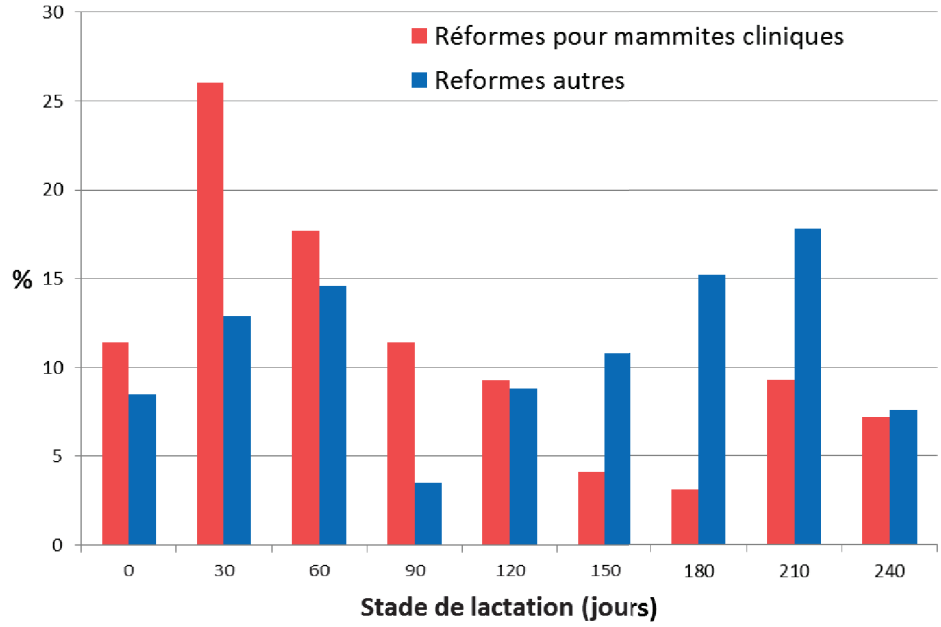


Figure 6 : Répartition des réformes selon leur stade de lactation des brebis primipares élevées au domaine expérimentale de la Fage

Vers la fin de la gestation, la mamelle subit des modifications physiologiques marquées augmentant le risque d'une nouvelle infection (gonflement de la glande mammaire, augmentation du volume de sécrétion, écoulement intermittent de colostrum). De plus, il a été remarqué que l'efficacité de la réponse anti-bactérienne, et en particulier l'activité des neutrophiles, était altérée durant cette période (Guidry et al., 1976, Newbould, 1976). D'autres études ont également révélé une diminution de la concentration en IgG dans le sang (Kehrli et al., 1989, Detilleux et al., 1995) ainsi qu'une diminution de la réponse lymphocytaire (Kashiwazaki et al., 1985, Ishikawa, 1987). Cependant, il est encore difficile de déterminer si les fonctions leucocytaires sont altérées en réponse aux facteurs péri-partum ou si l'incidence des maladies augmente en réponse au dysfonctionnement leucocytaire.

Chez les ruminants, et chez les bovins en particulier, la période péri-partum est fréquemment associée à un déficit énergétique. De nombreux auteurs suggèrent que ce déficit énergétique pourrait être responsable de l'augmentation de la fréquence de mammites durant cette période. L'objectif de la deuxième partie de cette introduction bibliographique sera donc de définir et expliquer les origines et conséquences du déficit énergétique associé à la période péri-partum.

II. Le bilan énergétique chez les ruminants laitiers

II.1. Besoins énergétiques et lactation

II.1.1. Synthèse du lait

De manière générale, le besoin se subdivise en besoin d'entretien (énergie nécessaire au métabolisme basal, aux activités musculaires vitales, à la thermorégulation et au renouvellement tissulaire), et en besoin de production (gestation, lactation). Cependant, c'est le besoin lié à la lactation qui prédomine chez les ruminants laitiers : le besoin énergétique est en effet étroitement lié à la quantité de lait que l'animal produit.

La majeure partie des constituants du lait est synthétisée par les CEM, mais certains constituants tels que l'eau, les vitamines, les sels minéraux, certaines protéines et certains acides gras sont extraits du sang artériel et passent directement dans le lait (tableau 5).

Tableau 5: Synthèse des constituants du lait de brebis

Constituants	Pourcentage	Synthétisé ou prélevé dans le sang artériel
Eau	82,2	Prélevé
Glucides	4,5	Lactose : Synthétisé à partir du glucose prélevé
Matières azotées totales	5,6	Caséines : Synthétisées Ig, Albumine : Prélevé
Azote non protéique	0,01 à 1,2 Urée : 0,3 à 0,4	Prélevé
Lipides	6,9	C4 à C16 : Synthétisé ≥ C16 : Prélevé
Cendres *(Calcium, Phosphore, Magnésium, Fer,..)*	0,8	Prélevé

En élevage laitier, la teneur en matière grasse du lait est évaluée à travers la mesure du taux butyreux (TB), qui constitue un des paramètres servant à évaluer la qualité du lait. Les principaux lipides sont des triglycérides, mais on retrouve aussi de faibles quantités de phospholipides, de cérébrosides, de caroténoïdes et de stérols. Une grande partie de ces lipides est synthétisée directement par les CEM. En revanche, les acides gras permettant la synthèse des triglycérides ont deux origines :

- la synthèse *de novo* (40 à 60%) dans le cytoplasme des CEM qui conduit à la formation d'acides gras à chaines courtes et moyennes (C4 à C16), et s'effectue à partir de l'acétate et du β-hydroxybutyrate plasmatique
- le captage dans le plasma par les CEM des acides gras à chaines longues (à partir de C16) circulant sous forme de triglycérides ou d'un pool d'acides gras non estérifiés liés à l'albumine. Ces acides gras longs proviennent de l'alimentation et de la mobilisation des tissus adipeux.

Les acides gras de C16 sont ainsi soit captés soit synthétisés. L'ensemble de ces acides gras est estérifié dans le réticulum endoplasmique avec le glycérol pour former un triglycéride. Les triglycérides sont ensuite sécrétés dans le cytoplasme sous forme de gouttelettes lipidiques de 1 à 10 µm de diamètre entourées de protéines et de lipides polarisés (Ollivier-Bousquet, 2002).

Le taux protéique (TP) est le second paramètre sur lequel est évaluée la qualité du lait. Les protéines peuvent provenir du compartiment sanguin ou être synthétisées directement dans les CEM. Les caséines sont les protéines majeures du lait et représentent environ 80% de la matière azotée totale contenue dans le lait. Les principales caséines, α et β, sont synthétisées, phosphorylées et glycosylées dans le réticulum endoplasmique avant d'être transférées dans l'appareil de Golgi. Elles s'agrègent alors entre elles pour former des micelles de caséines avec l'aide du calcium et du phosphate inorganique. Les autres protéines (lactoferrine, transferrine, enzymes,…) sont solubles et constituent donc les protéines du lactosérum. Les protéines synthétisées par la CEM rejoignent la lumière alvéolaire par exocytose tandis que les protéines du sérum (immunoglobulines, albumine) passent dans la lumière alvéolaire par transcytose au travers des CEM ou transitent par les espaces intercellulaires.

Chez les ruminants, 50 à 80% du glucose sanguin est capté par la mamelle afin de synthétiser avec l'UDP-galactose le glucide spécifique du lait : le lactose. Les besoins en glucose varient ensuite au cours de la lactation : ils évoluent de 2,5 kg/vache/j en début de lactation à 1 kg/vache/j en fin de gestation (Reynolds et al., 2003).

II.1.2. Variabilité de la production et composition du lait

La production et la composition du lait sont influencées par divers facteurs comme l'espèce, la race, le système d'élevage, la saison, le stade de lactation… (Tableau 6).

En 2014, la production de lait de brebis en France a été de 257,5 millions de litres de lait pour un cheptel d'environ 1,6 millions de brebis laitières, soit près de 25% du cheptel ovin (Source Institut de l'Elevage 2015).

En comparaison, la production de lait de vache en France en 2014 était de 24,6 milliards de litres de lait pour un cheptel d'environ 3,7 millions de vaches laitières.

Tableau 6 : Comparaison des productions laitières des ruminants laitiers en France (2015)

Espèce	Race	Production de lait par lactation (kg)	Durée moyenne de lactation (j)	TP (g/kg)	TB (g/kg)
Vache	Prim Holstein	9276	355	31,8	39,3
	Normande	6412	325	34,5	42,3
Brebis	Lacaune	308	169,6	54,3	72
	Manech Tête Rousse	227	161,3	50	67,7
Chèvre	Alpine	909	296	33,3	37,6
	Saanen	954	308	32,0	35,5

II.1.3. Besoins énergétiques pour la lactation

Le besoin énergétique d'un ruminant en lactation est exprimé en France en unités fourragères lait (1 UFL = 1,7 Mcal d'énergie nette pour la production laitière), et est quantifié dans les tables de l'INRA.

Pour une brebis en début de lactation, on peut déterminer le besoin énergétique par l'équation suivante :

$$besoin = 0.33 \times Poids^{0.75} + 0.71 \times PLS$$

Avec le Poids en kg, et PLS la production laitière standardisée en litres/jour

La production laitière standardisée est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$PLS = PL \times (0.0071 \times TB + 0.0043 \times TP + 0.2224)$$

Avec PL la Production Laitière en litres/jour, TB le taux butyreux, et TP le taux protéique

Le besoin énergétique d'une vache pleine en lactation est calculé par la formule suivante (INRA) :

$$besoin = [(0.041 \times PV^{0.75}) \times Iact] + PL \times [0.44 + (0.0055 \times (TB - 40)) + 0.0033 \times (TP - 31))] + (0.00072 \times PVnais \times e^{0.116 \times SemG})$$

Avec PV le Poids Vif, Iact l'Indice d'activité, TB le Taux butyreux ; TP le Taux Protéique, PVnais : poids vif du nouveau-né à la naissance, et SemG : Semaines de Gestation.

II.2. Les apports énergétiques

II.2.1. Glucides

L'alimentation des ruminants contient deux types de glucides : les glucides pariétaux (cellulose, hémicelluloses) et des glucides cytoplasmiques (amidon). Les glucides sont majoritairement dégradés dans le rumen par le microbiote, composé de protozoaires, de champignons, de bactéries et d'archées. Cette digestion conduit notamment à la formation d'acides gras volatils (AGV) : l'acétate (C2), le propionate (C3) et le butyrate (C4). Ils sont absorbés par la paroi du rumen dans la circulation sanguine. Le métabolisme énergétique des ruminants repose sur les AGV qui sont donc les principales sources d'énergie ; ils représentent 50 à 70% de l'énergie totale absorbée. Le reste de l'énergie est constitué de glucose (3 à 15 %), d'acides aminés (15 à 25 %) et de lipides (5 à 15 %).

Le butyrate est transformé en β-hydroxybutyrate par la muqueuse du rumen, avant passage dans la circulation sanguine, alors que l'acétate diffuse tel quel dans tout l'organisme. Après absorption, le propionate (C3) est utilisé pour la néoglucogenèse hépatique. En effet, les ruminants ont la particularité de synthétiser la grande majorité du glucose dont ils ont besoin à partir des métabolites issus de la digestion ruminale (Nafikov and Beitz, 2007). La principale molécule utilisée comme précurseur du glucose est le propionate, mais certains acides aminés, l'acide lactique et le glycérol peuvent également être utilisés.

II.2.2. Protéines

Pour les protéines, 60 à 70% de la quantité ingérée est dégradée dans le rumen et transformée en ammoniac NH_3. Les bactéries du rumen utilisent ensuite le NH_3 produit pour la synthèse des acides aminés. Les protéines digestibles dans l'intestin grêle (PDI) proviennent à la fois de protéines **alimentaires** non dégradées dans le rumen (PDI**A**), et de protéines d'origine **microbienne** (PDI**M**).

II.2.3. Lipides

Les triglycérides ingérés sont hydrolysés par les micro-organismes du rumen en acides gras. Les acides gras insaturés sont en majeure partie hydrogénés dans le rumen ; cette hydrogénation conduit en particulier à des intermédiaires de configuration géométrique *trans*. Comme la majorité des acides gras insaturés des rations ont 18 atomes de carbone, le produit

terminal de cette hydrogénation est majoritairement l'acide stéarique (C18 :0). Ces acides gras sont ensuite absorbés dans l'intestin grêle qui les ré-estérifie en triglycérides, puis transportés sous forme de lipoprotéines de très faibles poids moléculaires (VLDL).

II.2.4. Schéma-Bilan de l'origine des constituants du lait

La figure 7 ci-dessous présente et résume les différentes origines des constituants du lait.

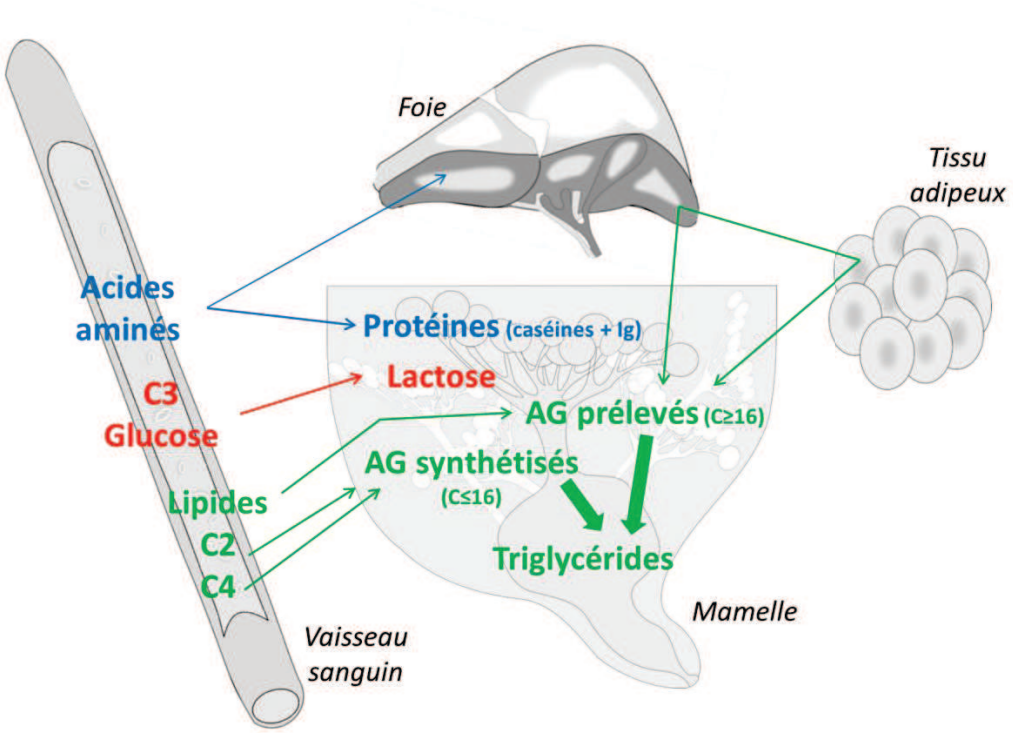


Figure 7 : Synthèse et origine des constituants du lait (d'après Enjalbert)

II.3. Bilan énergétique

II.3.1. Mesure du bilan énergétique

La mesure du bilan énergétique (BE) est traditionnellement réalisée de deux manières distinctes :

- la mesure des intrants/extrants
- la mesure de la variation des réserves corporelles

La première stratégie consiste à définir le BE comme la différence entre l'énergie nette acquise par l'alimentation et les besoins énergétiques générés par le maintien de l'homéostasie, par la production de lait, et éventuellement par la gestation. Mesurer le BE nécessite donc de mesurer l'apport alimentaire et surtout l'ingestion.

Afin de pouvoir estimer la consommation individuelle, il existe des dispositifs automatisés qui mesurent la quantité d'aliment ingérée par chaque animal notamment en unité expérimentale. Au cours d'une phase d'apprentissage, l'animal est habitué à l'utilisation d'une mangeoire accessible après l'ouverture d'une trappe déclenchée par la boucle électronique qu'il porte.

Il existe ensuite plusieurs méthodes permettant de calculer l'énergie nette apportée par la ration (Sniffen et al., 1992, Emmans, 1994, Tables INRA 2010). De manière générale, le BE peut se définir comme :

$$BE = ENI - besoin\ énergétiques$$

Avec ENI l'énergie nette ingérée.

En l'absence de mesure d'ingestion individuelle, des alternatives pour calculer le BE ont été proposées chez les vaches laitières. Comme énoncé ci-dessus, le BE peut en effet être estimé à partir des variations de l'état corporel (Note d'Etat Corporel, NEC) et de la mesure du poids de l'animal. Le BE est alors évalué à partir d'équations utilisant des estimations du poids de l'animal vide et sa masse graisseuse et protéique (Coffey et al., 2001) :

$$BE = energy\ in\ (lipid\ mobilized\ or\ stored\ (EEL) + protein\ mobilized\ or\ stored\ (EEP))$$

Selon les auteurs, les différences observées entre ce modèle prédictif et celui basé sur l'énergie nette ingérée et la production pourraient être occasionnées par i) la mesure approximative de l'énergie ingérée due au gaspillage de nourriture, ii) des prédictions erronées de la masse lipidique à partir du poids et de la NEC, iii) une combinaison de ces deux phénomènes. Le modèle basé sur la variation des réserves de l'animal semble donner une appréciation moins fine du BE que celui prenant en compte l'ENI et la production (Banos et al., 2005).

Friggens et al. (2007) ont également tenté d'établir un modèle prédictif du BE, estimé à partir des variations de l'état corporel en prenant en compte des mesures répétées de la quantité et de la composition du lait (protéines, lactose, matière grasse,...). D'après cette étude, l'échantillonnage automatisé, l'analyse en ligne du lait ainsi qu'une fréquence beaucoup plus élevée des mesures ont permis d'augmenter la précision de détermination du BE. A l'aide de modèles de régression des moindres carrés partiels (Partial Least Squares regression), les auteurs ont établi des équations de prédiction capables de déterminer le BE indépendamment de la race étudiée, en expliquant un fort pourcentage de la variance du BE (94-96%).

II.3.2. Corrélations entre BE et les critères phénotypiques laitiers

Le statut énergétique de la vache est assez bien corrélé au TB et au TP. En effet, nous allons voir dans la suite du chapitre que le déficit énergétique est associé à une augmentation de la concentration en lipides (mobilisation des réserves) et à une diminution de la concentration en protéines plasmatiques (utilisation pour la néoglucogénèse).

Selon Grieve et al. (1986), le rapport TB/TP est l'indicateur le plus sensible pour évaluer le statut nutritionnel de la vache laitière. En effet, d'après leur étude, le BE était négativement corrélé au TB (entre -0,07 et -0,65), positivement corrélé au TP (entre 0,12 et 0,47), et très négativement corrélé au rapport TB/TP (entre -0,36 et -0,74). Le ratio TB/TP était donc le prédicteur le plus sensible du statut énergétique de la vache, meilleur que chacun de ses composants pris individuellement.

D'après de Vries and Veerkamp (2000), c'est la variation du taux butyreux (ΔTB**)** qui serait le paramètre le mieux corrélé au BE, en particulier en début de lactation (r = 0,6). Cependant, la corrélation entre le ΔTB et le BE n'est plus que de 0,14 à partir de 180 jours de lactation.

II.4. Le péri-partum : origine du déficit énergétique

La période de transition est habituellement définie comme la période qui s'étend des deux à trois dernières semaines de la gestation aux deux à trois premières semaines de la lactation. Le BE est fréquemment négatif chez les bovins durant cette période en raison de l'augmentation marquée des besoins énergétiques pour la production, et concomitamment à une lente augmentation de la capacité d'ingestion ; il s'ensuit de manière fréquente des troubles métaboliques immédiatement après le vêlage. Chez les ovins en revanche, ces troubles touchent principalement les brebis prolifiques et apparaissent dans les dernières semaines ou les derniers jours de la gestation. Cette précocité des troubles s'explique par le fait que le ratio besoins nutritionnels / quantité ingérée de la brebis atteint son niveau le plus élevé avant la mise bas, en raison du développement rapide des fœtus et de la fréquence élevée de gémellité.

II.4.1. Evolution de la capacité d'ingestion

Chez la vache, la capacité d'ingestion diminue de 32% au cours des trois dernières semaines de la gestation, et 90% de cette diminution a lieu durant la dernière semaine (Hayirli et al., 2002). Les mécanismes de régulation de la capacité d'ingestion ne sont pas encore complètement connus, cependant une hypothèse avancée serait que la place occupée par

l'utérus dans la cavité abdominale en fin de gestation limite la possibilité de remplissage du rumen.

Le volume du rumen a en effet été négativement corrélé au volume des autres organes abdominaux chez des brebis abattues à différents stades de gestation et il est proportionnel à la capacité d'ingestion durant les quelques jours qui précèdent l'abattage de l'animal (Forbes, 1969). Cependant cette hypothèse ne suffit pas à elle seule à expliquer les variations de la capacité d'ingestion.

Les réserves corporelles pourraient également jouer un rôle puisque des vaches ayant un état d'engraissement trop marqué ont une capacité d'ingestion plus faible (Bines and Morant, 1983). De plus l'infusion d'acides gras à longues chaines chez la brebis a un effet dépresseur sur la capacité d'ingestion, confirmant la relation qui existe entre ces deux phénomènes (Vandermeerschen-Doizé and Paquay, 1984). Enfin, des études plus récentes (Allen et al., 2005, Allen et al., 2009) ont avancé l'hypothèse que le statut énergétique hépatique était un des régulateurs majeurs de la capacité d'ingestion chez les ruminants, en particulier chez les bovins laitiers.

II.4.2. Evolution des besoins énergétiques

Nous avons vu précédemment que le BE dépendait des besoins énergétiques incluant les besoins liés à la lactation ou à la gestation. Durant la période péri-partum, les besoins énergétiques sont accrus en raison de la croissance du fœtus, de la parturition, et de la synthèse du lait et du colostrum (Drackley, 1999). Chez les vaches, les besoins énergétiques dus à la croissance du fœtus en fin de gestation sont plutôt faibles car le fœtus croît lentement, son développement journalier requérant environ 0,82 MCal et 117g de protéines (Tableau 7).

Tableau 7 : Besoins métaboliques de la vache pour le développement du fœtus et la synthèse du colostrum à la fin de la gestation (d'après Goff and Horst, 1997).

Développement du fœtus en fin de gestation (par jour)	Synthèse du colostrum (par 10 kg)
0.82 Mcal d'énergie	11 Mcal d'énergie
117 g de protéines	140 g de protéines
10.3 g de calcium	23 g de calcium
5.4 g de phosphore	9 g de phosphore
0.2 g de magnésium	1 g de magnésium

Ainsi, la forte augmentation de la demande énergétique est davantage liée à la lactation qu'à la gestation comme on peut l'observer sur la figure 8 qui présente les besoins en énergie, glucose, acides aminés et acides gras, pour une vache Holstein à 250 jours de gestation et à 4 jours après le vêlage (Bell, 1995).

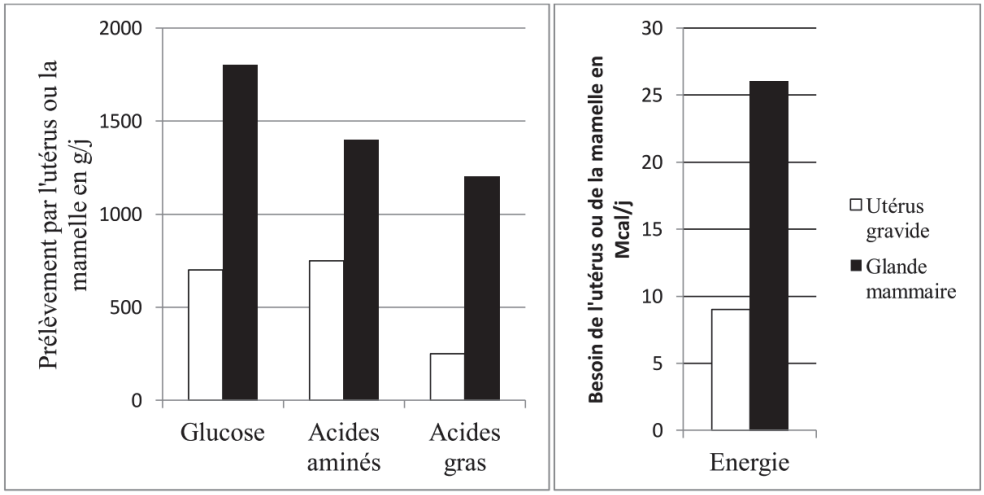


Figure 8 : Comparaison des besoins pour l'utérus (j 250 de la gestation) et la mamelle (j 4 postpartum) chez la vache de race Holstein (Bell, 1995)

En revanche, les besoins énergétiques de la brebis prolifique en fin de gestation augmentent fortement : ils évoluent ainsi pour une brebis de 60 kg portant deux agneaux de 1,4 MCal vers six semaines avant la parturition à 2,5 MCal au moment de la mise-bas (Gadoud, 1992).
Gross et al. (2011) ont cependant montré qu'un déficit énergétique induit en milieu de lactation (100 jours de lactation) avait des conséquences métaboliques moins marquées que le déficit énergétique spontané du début de lactation, malgré des besoins énergétiques pour la lactation plus élevés. Ainsi, l'augmentation des besoins énergétiques pour la lactation n'explique que partiellement le déficit spontané observé en début de lactation et d'autres mécanismes de régulation sont susceptibles de jouer un rôle important dans ce phénomène.

II.5. Conséquences du déficit énergétique sur le métabolisme

II.5.1. La lipomobilisation associée au déficit énergétique péri-partum

En réponse à un bilan énergétique négatif, les réserves adipeuses sont mobilisées et utilisées comme source d'énergie supplémentaire afin de couvrir, en particulier, les besoins de la production laitière. Différents tissus adipeux contribuent à la lipomobilisation : les lipides

proviennent de 20 à 30% du tissu adipeux périrénal, épiploïque et mésentérique en début de lactation (tableau 8).

Tableau 8 : Contribution des tissus adipeux (TA) viscéraux à la mobilisation des lipides chez la brebis en gestation

Stade (jours de gestation)	Lipides initiaux (kg)	Nombre de fœtus - Niveau alimentaire	Variation des lipides corporels	Dont TA périrénal ((%)	Dont TA épiploïque et mésentérique (%)	Références
105	6,1	1,3 - Bas	-1,6	14	9	(Russel et al., 1968)
105-145	4,5	1,3 - Bas	- 1,5	10,	22	
74-116	18,6	1 - Haut	- 1,4	17	40	(Robinson et al., 1978)
	18,1	2 - Bas	- 3,5	12	29	
116-144	17,2	1 - Haut	- 2,2	13	29	
	14,6	2 - Bas	- 4,9	11	25	

II.5.2. L'oxydation des AGNE

La mobilisation des lipides tissulaires implique une augmentation de la concentration des Acides Gras Non Estérifiés (AGNE) plasmatiques, produits à la suite de l'hydrolyse des triglycérides du tissu adipeux. Les AGNE circulants sont en partie captés par le foie (environ 20%) et une part importante est oxydée soit totalement (formation de CO_2 par le cycle de Krebs), soit partiellement (formation de corps cétoniques).

Les AGNE résultant de l'hydrolyse des triglycérides sont principalement l'acide palmitique (16:0) et l'acide stéarique (18:0) (Contreras et al., 2010). Dans le cytoplasme, les AGNE s'associent avec le coenzyme A (CoA) pour former un acyl-CoA. Dans la mitochondrie de la cellule hépatique, l'acyl-CoA subit ensuite une béta-oxydation pour conduire à la formation d'acétyl-CoA (Figure 9).

L'Acétyl-CoA ainsi formé peut ensuite réagir avec l'oxalo-acétate pour produire du citrate (qui peut être utilisé par le cycle de Krebs). Cependant, l'oxaloacétate est également un précurseur du glucose. En fin de gestation ou en lactation, lorsque la demande tissulaire de glucose est forte (voir figure 8), l'oxaloacétate est utilisé en priorité pour la néoglucogenèse et se raréfie. Du fait de la carence relative en composés glucoformateurs dans le foie, l'oxydation de l'acétyl-CoA par le cycle de Krebs ralentit, et ce dernier s'accumule aussi longtemps que dure le déficit glucosé. L'acétyl-CoA en excès va alors être dirigé vers la voie de la cétogenèse (Suriyasathaporn et al., 2000).

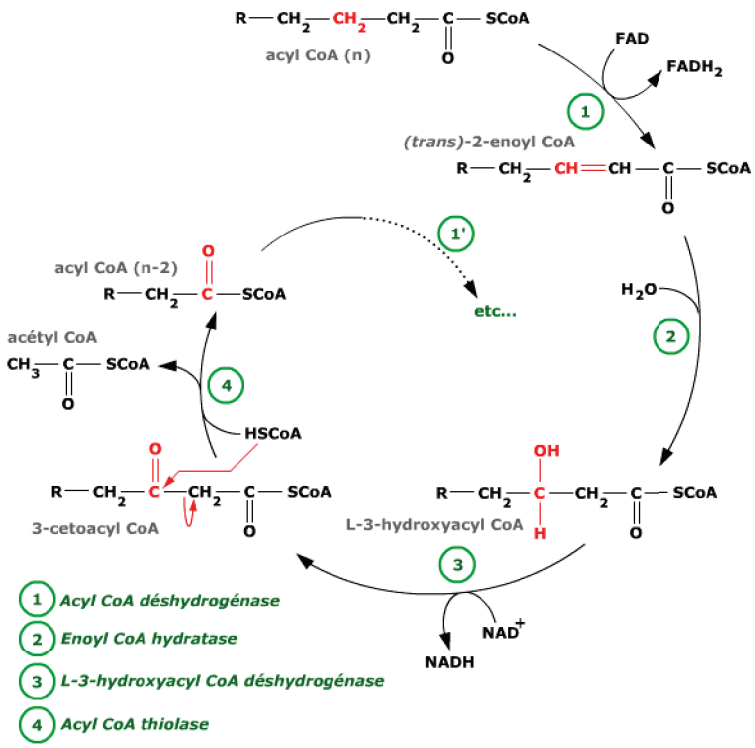


Figure 9 : La β-oxydation des acides gras (image provenant de http://cmapspublic.ihmc.us/)

II.5.3. La cétogénèse

La cétogenèse a également lieu dans les mitochondries des hépatocytes. L'acétyl-CoA non utilisé par le cycle de Krebs est en effet oxydé partiellement en acétoacétyl-CoA puis condensé en AcétoAcétate (Figure 10). Ce dernier est ensuite partiellement et de façon réversible réduit dans la mitochondrie en β-HydroxyButyrate (BHB). Les corps cétoniques constituent une source d'énergie pour les tissus périphériques comme la mamelle, lorsque la glycémie est basse. La transformation par le foie des AGs en corps cétoniques peut parfois être ralenti par le manque de glucose. Les AG s'accumulent alors dans le foie, c'est la stéatose (Reid et al. 1979).

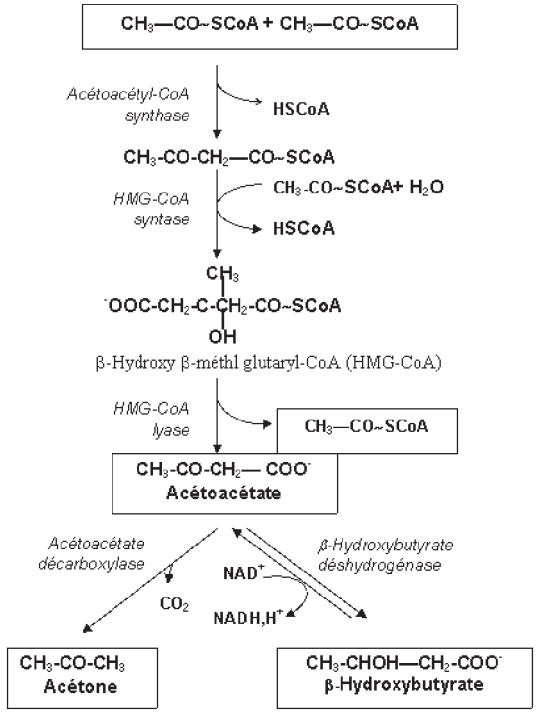


Figure 10 : La cétogénèse

II.5.4. Synthèse des mécanismes métaboliques mis en jeu lors d'un déficit énergétique

La figure 11 montre les différents mécanismes impliqués par un déficit énergétique.

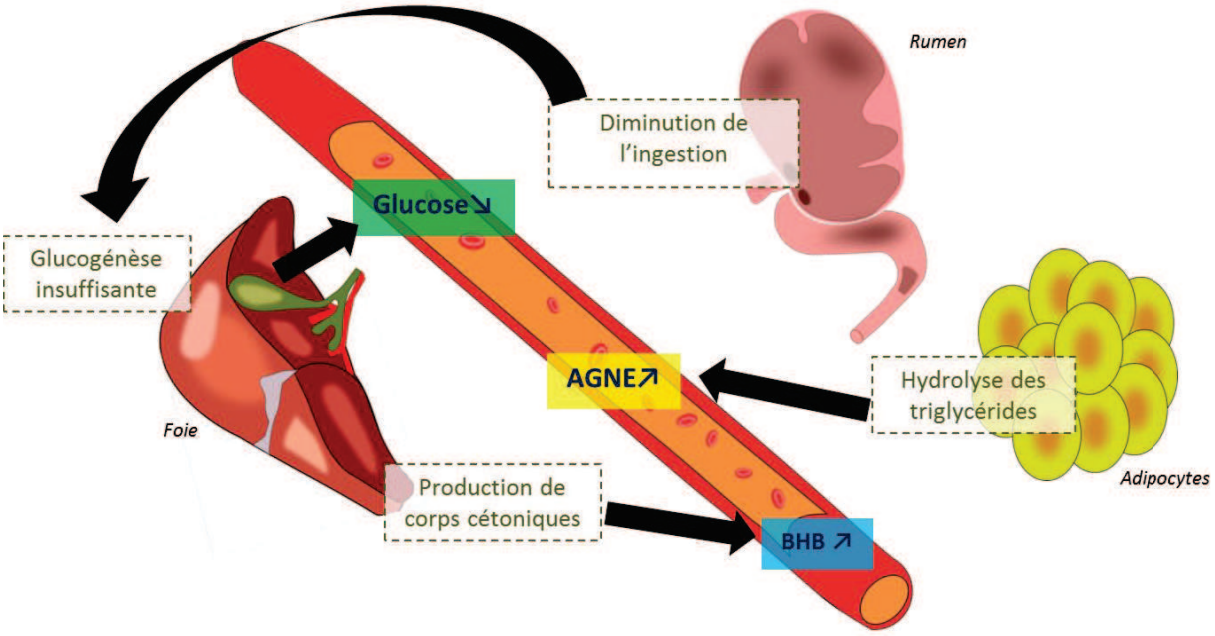


Figure 11 : Conséquences d'un déficit énergétique sur le métabolisme

II.6. Les maladies métaboliques liées au déficit énergétique

II.6.1. La cétose

La cétose est une maladie dont le risque est maximal en début de lactation chez la vache laitière (Goff and Horst, 1997). Pour que l'état de cétose apparaisse, il faut que la production des corps cétoniques dépasse les capacités maximales d'utilisation par les tissus périphériques. La mobilisation des acides gras libres est alors élevée, et le glucose ainsi que les composés glucoformateurs sont peu disponibles. La simple mobilisation des acides gras n'est pas suffisante pour provoquer une augmentation forte de la cétogenèse.

La cétose subclinique correspond à une augmentation des corps cétoniques dans le sang, sans signe clinique patent. Elle survient principalement en début de lactation. Selon les auteurs, sa prévalence est comprise entre 12% et 40% et son incidence peut atteindre jusqu'à 80% dans certains troupeaux (McArt et al., 2013). Elle ne peut être confirmée que par mesure de la concentration de certains corps cétoniques, qu'elle soit semi-quantitative (bandelette) ou quantitative (appareils de mesure portable ou au laboratoire).

La cétose clinique dite primaire apparaît généralement au cours des 6 semaines post-partum. Les signes cliniques sont une diminution de la production de lait, un amaigrissement, une alternance diarrhée/constipation, l'isolement du reste du troupeau, et exceptionnellement des signes nerveux comme l'hyperexcitabilité. La cétose clinique touche principalement les vaches hautes productrices de lait.

De manière générale, la cétose engendre des pertes économiques via la diminution de la production laitière, mais peut également avoir un impact négatif sur les fonctions de reproduction. D'après Rajala-Schultz et al. (1999), une cétose clinique peut en effet entrainer des pertes de production pouvant atteindre 535 kg de lait pour une lactation de 305 jours chez des vaches de quatrième rang de lactation ou plus. De plus, les vaches en cétose sont souvent dysorexiques (ont des troubles de l'appétit), ce qui exacerbe encore le déficit énergétique. Le traitement de la cétose consiste à apporter de l'énergie afin de réduire momentanément le déficit énergétique en perfusant à l'animal du glucose ou en administrant des composés glucoformateurs (monopropylène glycol), et/ou en réduisant les besoins énergétiques, donc l'exportation de lait par l'administration de glucocorticoïdes.

Enfin, la cétose est fréquemment associée à d'autres affections, dont le déplacement de la caillette à gauche, les mammites cliniques ou subcliniques, l'endométrite (inflammation chronique de l'utérus) ou l'apparition de kystes ovariens (Andersson, 1988).

II.6.2. La toxémie de gestation

Tout comme la cétose, la toxémie de gestation provient d'un dérèglement du métabolisme énergétique. En revanche, la toxémie de gestation touche principalement la brebis dans le dernier mois précédant la mise-bas, alors que la cétose concerne davantage les vaches au cours des semaines qui suivent la mise-bas. Nous avons en effet vu précédemment que les besoins énergétiques augmentaient fortement chez la brebis prolifique en fin de gestation (cf II.4.b.) D'après Rook (2000), 80% de la croissance du fœtus chez la brebis se fait pendant les six dernières semaines et entraine une forte augmentation de la demande en glucose. Lors de la gestation, la consommation de glucose par le fœtus est associée à la diminution de synthèse d'insuline par le pancréas. Cette diminution affecte la capacité de réaction de la mère face aux fluctuations de la glycémie, observable grâce à des tests de tolérance au glucose réalisés à l'aide de perfusions intraveineuses (Sigurdsson, 1988). Ces observations suggèrent que la toxémie de gestation est similaire à la cétose de type II de la vache laitière.

De plus, la cétose est rarement mortelle alors que la toxémie de gestation est souvent fatale. L'autopsie révèle alors généralement un utérus portant deux agneaux ou plus, ou un agneau de grande taille (Rook et al., 1990). Les lésions cérébrales observées rappellent les lésions typiques d'hypoglycémie rencontrées dans l'espèce humaine (East, 1983), suggérant que la mort est provoquée par une encéphalopathie due à une hypoglycémie. La prévalence de la toxémie de gestation reste cependant très faible par rapport à celle de la cétose (1 à 2%) et est quasiment nulle chez les primipares (Rook, 2000).

III. Relation déficit énergétique et immunité

Comme nous l'avons vu précédemment, la période péri-partum est une période où l'animal en production est sujet à un déficit énergétique qui est considéré comme physiologique tant il est fréquent. Durant cette période, l'animal peut subir des modifications métaboliques, mais aussi des altérations des fonctions immunitaires, qui pourraient conduire à l'augmentation du risque d'apparition des maladies d'origine infectieuse comme la mammite ou la métrite. L'hypothèse d'une relation entre le déficit énergétique, les maladies métaboliques et le risque infectieux autour de la parturition a ainsi été mise en avant par de nombreux auteurs.

III.1. Etudes épidémiologiques du lien entre mammite et cétose, ou de leurs phénotypes associés

Afin d'avoir un point de vue global sur une éventuelle relation entre occurrence de la cétose et mammites, cette partie présente les études épidémiologiques des phénotypes associés à ces deux affections observées dans des grands effectifs ou troupeaux. Ainsi, Jánosi et al. (2003) ont étudié un groupe de 333 vaches laitières dont les CCS étaient faibles, avec un déficit énergétique post-partum plus ou moins marqué. D'après leur étude, les vaches ayant une concentration sanguine de BHB supérieure ou égale à 1 mmol/L avaient une fréquence accrue de mammites, et pouvaient donc être considérées comme prédisposées aux mammites dans les quatre semaines suivant la parturition. Les résultats n'étaient toutefois significatifs que pour les mammites associées à des germes environnementaux (principalement des bactéries à Gram négatif).

Nyman et al. (2008) ont étudié les associations entre les concentrations plasmatiques de différents métabolites et les CCS autour du vêlage chez 287 vaches primipares. Les résultats ont montré que des concentrations de BHB élevées avant la parturition étaient associées à des CCS plus bas, alors que des concentrations élevées en AGNE au même moment étaient associées à des CCS plus élevées. Ces résultats sont difficilement interprétables. Cependant les auteurs font l'hypothèse que la lipomobilisation avant la parturition est associée à un statut inflammatoire de la mamelle plus marqué.

III.2. Corrélations génétiques entre un déficit énergétique et risque d'IMI

D'autres auteurs ont choisi d'étudier les paramètres génétiques et en particulier les corrélations génétiques pour caractériser la relation entre le déficit énergétique et le risque d'IMI. Ainsi, Zwald et al. (2004) ont étudié 272 576 lactations de 161 622 vaches parmi 646 troupeaux afin d'évaluer l'héritabilité et les corrélations génétiques entre cétose, et mammite clinique. Cette corrélation était modérée mais positive (0,17), suggérant une prédisposition génétique partiellement partagée pour ces deux affections. De manière similaire, Heringstad et al. (2005) ont étudié les corrélations génétiques entre les mammites cliniques, l'hypocalcémie, la cétose, et la rétention placentaire sur les trois premières lactations de 322 227 filles de 2 411 vaches de race Norvégienne Rouge. Les corrélations génétiques entre cétose et mammites cliniques étaient de 0,26, 0,11 et 0,16 respectivement pour la première, seconde, et troisième lactation. Ces études confirment donc que la corrélation génétique est faible, mais effectivement détectée entre les mammites cliniques et la cétose.

Koeck et al. (2014) ont étudié les corrélations entre le BHB du lait de vaches Holstein Canadiennes en début de lactation et des phénotypes prédicteurs du bilan énergétique (rapport TB/TP et NEC) et les mammites (mammite clinique et SCS). L'héritabilité mesurée pour le BHB du lait dans leur étude était comprise entre 0,14 et 0,29. Les corrélations génétiques du BHB du lait entre les différentes lactations étaient élevées pour les lactations proches et plus faibles pour les lactations éloignées. La concentration de BHB du lait en début de lactation était corrélée au rapport TB/TP (0,49), à la NEC (-0,35) et aux mammites cliniques (0,48). De plus, le BHB était corrélé aux SCS en début de lactation (0,19 pour 5–20 DIM et 0,11 pour 21–40 DIM). L'ensemble de cette étude établit donc un lien génétique entre la concentration du BHB du lait, le BE et la santé mammaire globale (SCS et mammites cliniques).

III.3. Conséquences d'un déficit énergétique sur la réponse inflammatoire

En 2010, Contreras et al. ont étudié les effets des AGNE sur la réponse inflammatoire des cellules endothéliales. Des cellules endothéliales aortiques bovines ont été cultivées *in vitro* en présence de différentes concentrations d'AGNE, reflétant les concentrations physiologiques mesurées chez des vaches pendant la période de transition. En présence d'une forte concentration d'AGNE, les cellules endothéliales ont synthétisé davantage de cytokines IL-6 et IL-8, et de molécules d'adhésion ICAM1 et VCAM1 que les cellules endothéliales cultivées dans des milieux avec une faible concentration d'AGNE. De plus, la concentration de dérivés réactifs de l'oxygène était plus élevée dans les cellules cultivées en présence des concentrations d'AGNE élevées.

Le stress oxydatif était donc plus marqué dans ces cellules que dans les cellules cultivées avec une faible concentration d'AGNE. La supplémentation en AGNE a également entrainé la synthèse de métabolites dérivés de l'acide linoléique connus pour avoir des propriétés pro-inflammatoires. Par conséquent, les auteurs ont conclu que l'augmentation de la concentration en AGNE dans le sang pouvait stimuler la réponse pro-inflammatoire des cellules endothéliales, et donc altérer la réponse et la migration leucocytaires lors d'une inflammation.

III.4. Modification du chimiotactisme des leucocytes par le déficit énergétique

Suriyasathaporn et al. (1999) se sont intéressés aux effets des corps cétoniques sur les capacités chimiotactiques des leucocytes. Le chimiotactisme correspond à la réponse des leucocytes à des substances chimiques qui provoquent leur déplacement dans un milieu. La résolution d'une infection est fortement liée à la rapidité et à l'intensité de l'afflux de ces cellules vers le foyer de l'infection. Dans cette étude, le chimiotactisme des leucocytes a été étudié *in vitro* en présence de concentrations croissantes de corps cétoniques (BHB, AcAc et acétone). Des leucocytes provenant de vaches dont la concentration sanguine de BHB était faible ont été utilisés et cultivés dans ces différents milieux. Les concentrations des corps cétoniques dans les différents milieux ont été ajustées afin de simuler celles mesurées lors de cétose subclinique ou clinique. Suriyasathaporn et al. (1999) ont pu constater que le chimiotactisme des leucocytes provenant de vaches avec de faibles concentrations en BHB était significativement plus faible dans un milieu correspondant à un niveau de cétose clinique (donc avec de fortes concentrations en corps cétoniques) qu'en milieu correspondant à un niveau de cétose subclinique (concentration en corps cétoniques plus faibles). L'augmentation de la concentration des corps cétoniques dans le milieu de culture des leucocytes était donc associée à une dégradation des signaux chimiotactiques.

De même, Zarrin et al. (2014) avaient observé un recrutement des leucocytes dans le lait significativement plus faible ($p<0,01$) suite à une injection de LPS chez des animaux hypercétonémiques. L'hypercétonémie avait été provoquée par perfusion intraveineuse d'une solution de BHB pour obtenir une concentration plasmatique de 1,5 à 2,0 mmol/L, une concentration proche de celle observée lors de déficit énergétique péri-partum.

Enfin, Perkins et al. ont étudié en 2001, l'expression des molécules d'adhésion des leucocytes chez des bœufs Holstein soumis à une restriction alimentaire. Le déficit énergétique induit par la restriction (60% des besoins) a entrainé une augmentation significative de la concentration des AGNE mais n'a eu aucun ou qu'un faible effet sur l'expression des molécules d'adhésion par les leucocytes. Ces résultats suggèrent donc que le déficit énergétique seul n'a pas modifié significativement l'expression des molécules d'adhésion des leucocytes.

Ces données suggèrent donc que le déficit énergétique pourrait avoir un effet sur le chimiotactisme des leucocytes, qui ne serait pas lié à l'expression de molécules d'adhésion. Il est cependant important de remarquer que l'altération du chimiotactisme des leucocytes n'a jamais été observée directement *in vivo* (Moyes et al., 2009).

III.5. Effets d'un déficit énergétique sur les fonctions des neutrophiles

En 1988, Kluciński et al. (1988) ont réalisé une étude sur l'efficacité de l'activité phagocytaire des neutrophiles du lait en présence de BHB, d'acétoacétate, et d'acétone. Lors de cette expérience, les neutrophiles furent isolés de 16 vaches saines et incubés en présence de différentes concentrations de corps cétoniques. L'activité phagocytaire des neutrophiles du lait était significativement inhibée en présence de BHB, d'acétoacétate, et d'acétone.

De plus, Scalia et al. (2006) ont étudié *in vitro* l'influence des AGNE sur les neutrophiles bovins. Ils ont utilisé des concentrations d'AGNE similaires à celles observées lorsque la mobilisation des réserves corporelles est faible, moyenne ou marquée. Les capacités phagocytaires des neutrophiles ne furent pas affectées par la concentration croissante d'AGNE. En revanche, la viabilité des neutrophiles fut diminuée et la nécrose accentuée en présence d'une concentration importante d'AGNE.

Moyes et al. (2009) ont soumis cinq vaches Holstein en milieu de lactation à une restriction alimentaire correspondant à 60% de leurs besoins pendant sept jours, et cinq autres vaches Holstein furent utilisées comme témoins avec un régime *ad libitum*. Après cinq jours de restriction, toutes les vaches ont reçu une inoculation intra-mammaire de *Streptococcus uberis* dans un quartier sain. Toutes les vaches développèrent des signes systémiques associés à la mammite. Les concentrations sanguines d'AGNE et de BHB étaient plus élevées chez les vaches en restriction énergétique. Les capacités phagocytaires des neutrophiles sanguins étaient plus faibles chez les vaches en restriction énergétique que chez les vaches du régime témoin au moment de l'inoculation. Cependant, les fonctions phagocytaires ont diminué dans les deux groupes durant les 36h suivant l'inoculation. La restriction énergétique n'a donc eu qu'un faible effet sur les fonctions phagocytaires des neutrophiles sanguins.

Ces données suggèrent donc qu'une restriction énergétique pourrait avoir un effet sur les fonctions phagocytaires des neutrophiles. L'efflux primaire de neutrophiles est indispensable en cas de mammites (cf. chapitre 1). La perte de fonction de neutrophiles en cas de déficit énergétique pourrait donc être un mécanisme important de l'augmentation de la sensibilité aux mammites durant la période péri-partum.

III.6. Conséquences d'un déficit énergétique sur les fonctions lymphocytaires

Franklin et al. (1991) ont mesuré l'effet de la concentration en corps cétoniques, acétate, butyrate et glucose sur la prolifération *in vitro* des lymphocytes. D'après leur étude, les corps cétoniques, le butyrate et le glucose ont de faibles effets sur la prolifération des lymphocytes bovins *in vitro*. Seul l'acétate, à des concentrations similaires à celles observées lors de cétose aurait un effet immunodépresseur qui pourrait altérer la réponse immunitaire *in vivo*.

De plus, Lacetera et al. (2004) ont étudié *in vitro* l'effet de différentes concentrations d'AGNE sur les fonctions des cellules mononuclées prélevées chez des génisses en milieu de gestation. Les cellules prélevées furent incubées en présence de faibles concentrations d'AGNE, similaires à celles observées chez des vaches saines, et de fortes concentrations d'AGNE similaires à celles observées chez des vaches en cétose. La synthèse d'ADN par les cellules mononucléées (lymphocytes, monocytes), ainsi que la sécrétion d'IgM et d'IFN-γ était significativement diminuée lorsqu'elles étaient cultivées en présence de fortes concentrations d'AGNE. Ces résultats étaient en accord avec une étude réalisée par la même équipe en 2002 sur des ovins (Lacetera et al., 2002). Suivant le même protocole, les résultats ont également montré que l'augmentation de la concentration plasmatique des AGNE avait probablement des effets négatifs sur les fonctions lymphocytaires. En revanche, les cellules incubées en présence de BHB à des concentrations similaires à celles observées chez des ovins en cétose, ne présentaient d'altération des fonctions lymphocytaires. L'équipe en a donc conclu que, lors de cétose, les AGNE plutôt que le BHB étaient responsables de la modification des fonctions lymphocytaires.

III.7. Synthèse des effets possibles d'une restriction énergétique sur les fonctions immunitaires

De nombreuses études ont donc été réalisées pour étudier les conséquences d'un déficit énergétique sur les fonctions immunitaires. Plusieurs stratégies ont été utilisées :

- Induire un déficit énergétique chez les ruminants et étudier les fonctions immunitaires *ex vivo*

- Etudier les fonctions des cellules immunitaires *in vitro* après incubation ou culture avec des métabolites liés au déficit énergétique (AGNE, BHB)
- Perfuser des métabolites liés à la cétose et mesurer simultanément les altérations de la réponse inflammatoire

D'autre part, comme nous l'avons vu, de nombreuses fonctions immunitaires peuvent être étudiées : expression des molécules d'adhésion, expression et production de cytokines, chimiotactisme, viabilité, prolifération ou synthèse de l'ADN, …

Le tableau 9 résume les différents résultats observés sur les conséquences d'un déficit énergétique ou d'une augmentation des concentrations d'AGNE ou de corps cétoniques sur les fonctions immunitaires des leucocytes.

Tableau 9 : Conséquences d'un déficit énergétique ou d'une augmentation des concentrations en AGNE ou en corps cétoniques sur les fonctions immunitaires des leucocytes

	Inhibition	Activation	Aucun effet observé	Références
Déficit énergétique	Fonctions phagocytaires des neutrophiles		Expression des molécules d'adhésion	Perkins et al., 2001 Moyes et al., 2009
Acides Gras Non Estérifiés	Viabilité des neutrophiles Synthèse d'ADN des cellules mononuclées Sécrétion d'IgM et d'IFN-γ des cellules mononuclées (Bovins et Ovins)	Synthèse de cytokines (IL-6, IL-8) et de molécules d'adhésion (ICAM1 et VCAM1) des cellules endothéliales	Fonctions phagocytaires des neutrophiles	Lacetera et al., 2002 Lacetera et al., 2004 Scalia et al., 2006 Contreras et al., 2010
Corps cétoniques	Phagocytose des neutrophiles du lait Chimiotactisme des leucocytes		Prolifération des lymphocytes Fonctions lymphocytaires	Kluciński et al., 1988 Franklin, Young, et Nonnecke, 1991 Suriyasathaporn et al.,1999 Lacetera et al., 2002

L'intérêt croissant de la société pour des systèmes d'élevages respectueux de l'environnement, du bien-être des animaux et des produits de qualité sanitaire élevée est illustré par le nombre de polémiques que ces sujets suscitent. Afin de répondre à ces attentes, la communauté scientifique s'applique à étudier différentes voies d'optimisation des systèmes d'élevage et à répondre à cette demande. En particulier, le développement de systèmes d'élevages cherchant à valoriser les ressources fourragères (pâturage, foin) et à diminuer les intrants alimentaires de type concentré, dans des approches considérées comme plus agro-écologiques, sont aussi susceptibles de créer plus souvent des situations de déficit énergétique pouvant fragiliser les animaux. Il est donc important d'identifier les animaux capables de mieux supporter ces différents stress et éventuellement d'adapter les objectifs de sélection des animaux d'élevage afin d'inclure des caractères de robustesse comme la diminution de la sensibilité aux mammites, au parasitisme ou à la cétose.

Nous avons pu voir dans l'introduction bibliographique que les mammites représentent un problème majeur en élevage laitier car elles entraînent des pertes économiques importantes pour les filières de ruminants laitiers. Ainsi, le principal enjeu de ma thèse qui est d'analyser des conditions qui permettraient de réduire la fréquence des mammites, s'inscrit à la fois dans des problématiques scientifiques, économiques mais aussi sociétales.

L'introduction bibliographique nous a permis de constater que de nombreuses études relayent la présence d'un lien entre déficit énergétique et sensibilité aux IMIs, sans forcément fournir d'explications sur les mécanismes en jeu. C'est dans ce cadre que s'inscrit l'objectif de mon étude : mieux appréhender et comprendre le lien ou l'interaction éventuelle entre le déficit énergétique et la sensibilité aux mammites. Deux objectifs plus fins ont été définis pour ce travail de thèse :

- Evaluer les effets d'un déficit énergétique sur la réponse à une inflammation mammaire
- Evaluer l'impact de l'interaction éventuelle entre la réponse au déficit énergétique et la prédisposition génétique aux mammites sur la réponse métabolique et inflammatoire

Pour atteindre ces objectifs, un protocole expérimental original a été conçu à l'unité expérimentale de La Fage. La brebis Lacaune a été utilisée comme animal-modèle pour étudier ces mécanismes. Des animaux issus d'une sélection divergente sur la sensibilité aux infections mammaires ont été utilisés afin de créer de la variabilité génétique contrastée sur les mécanismes sous-jacents à la réponse mammaire. Les 48 brebis primipares appartenaient ainsi aux lignées divergentes CCS (CCS+ : n=24, CCS- : n=24), issues de la sélection décrite dans l'introduction bibliographique. La moitié de ces brebis a été alimentée avec une ration de faible densité énergétique (60% des besoins) afin d'induire un déficit énergétique. Après 10 jours de restriction alimentaire, les animaux ont été soumis à une épreuve inflammatoire (Figure 12).

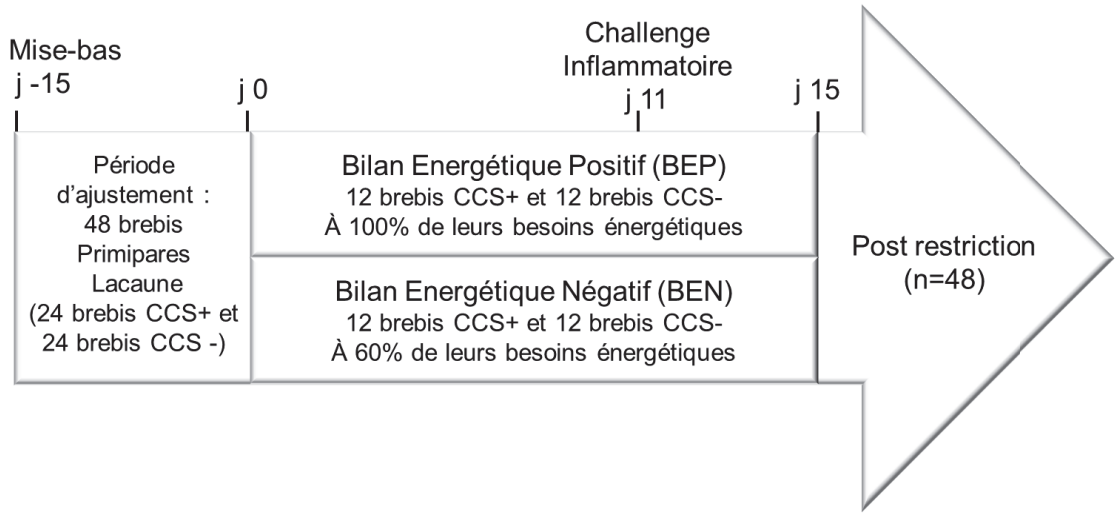


Figure 12 : Schéma expérimental

Trois approches ont alors été utilisées pour évaluer les effets du fond génétique et de la restriction énergétique sur la réponse métabolique et inflammatoire :

- Une approche phénotypique au travers d'un monitoring du poids, de l'état corporel, de la production laitière, des concentrations en métabolites sanguins, et de l'analyse des fréquences des types cellulaires dans le sang et le lait par cytométrie en flux des 48 brebis
- Une approche transcriptomique par analyse RNAseq du transcriptome sanguin de 24 brebis à 4 pas de temps de l'expérience
- Une intégration des données transcriptomiques avec les données phénotypiques

Etude 1 : Etude phénotypique des interactions entre bilan énergétique et prédisposition aux mammites au cours d'une épreuve inflammatoire

Article publié dans Journal of Dairy Science

Objectif et démarche

L'objectif de cette étude était d'étudier, au niveau phénotypique, l'interaction éventuelle entre le déficit énergétique et la prédisposition à l'inflammation mammaire. L'analyse a porté sur les 48 brebis primipares des lignées CCS (24 CCS- et 24 CCS+) soumises à la restriction énergétique et à l'épreuve inflammatoire. Les phénotypes étudiés étaient :

- La production laitière (quantité de lait, TB et TP)
- Le poids de l'animal
- La note d'état corporel (NEC)
- Les métabolites sanguins : Glucose, Insuline, AGNE, BHB et T3
- La santé de la mamelle : SCS par hémi-mamelle et valeur moyenne à la mamelle.

Résultats

L'analyse phénotypique a mis en évidence une réponse des brebis au déficit énergétique similaire à celle observée chez les bovins : diminution de la production laitière, du poids, de la NEC et de la concentration du glucose, et augmentation du rapport TB/TP et des concentrations plasmatiques en AGNE et BHB. A l'exception de la période inflammatoire, les brebis de la lignée CCS+ ont confirmé avoir davantage de cellules somatiques dans le lait que les brebis de la lignée CCS-. L'épreuve inflammatoire a entraîné un intense recrutement de cellules somatiques dans le lait chez toutes les brebis, quel que soit la lignée ou le bilan énergétique. Une interaction entre la lignée génétique et le bilan énergétique a pu être identifiée. En effet, les brebis de la lignée CCS+ ont perdu davantage de poids et avaient des concentrations plus élevées en BHB et AGNE que les brebis de la lignée CCS- en réponse à la restriction énergétique.

Conclusion

Les brebis de la lignée CCS+ ont mobilisé davantage leurs réserves corporelles que les brebis de la lignée CCS- en réponse à la restriction nutritionnelle. Ce résultat suggérait que les brebis génétiquement plus sensibles aux mammites étaient également prédisposées à l'apparition de la cétose.

J. Dairy Sci. 99:480–492
http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9785
© 2016, THE AUTHORS. Published by FASS and Elsevier Inc. on behalf of the American Dairy Science Association®. Open access under CC BY-NC-ND license.

Response to dietary-induced energy restriction in dairy sheep divergently selected for resistance or susceptibility to mastitis

J. Bouvier-Muller,*†[1] C. Allain,*[1] F. Enjalbert,* G. Tabouret,† D. Portes,‡ C. Caubet,† C. Tasca,† G. Foucras,†[2] and R. Rupp*[2,3]
*INRA, Unité Mixte de Recherche (UMR) 1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage, F-31326, Castanet-Tolosan, France
†Université de Toulouse, École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT), INRA, UMR 1225, Interactions Hôtes-Agents Pathogènes (IHAP), F-31076 Toulouse, France
‡INRA, Unité Expérimentale 0321 Domaine de La Fage, F-12250 Roquefort sur Soulzon, France

ABSTRACT

Dairy ruminants experiencing a severe postpartum negative energy balance (NEB) are considered to be more susceptible to mastitis. Although the genetic variability of mastitis resistance is well established, the biological basis of the link between energy metabolism and resistance is mostly unknown. The aim of this study was to characterize the effect of NEB on metabolism and immune response according to the genetic background for mastitis resistance or susceptibility. Forty-eight ewes from high and low somatic cell score (SCS) genetic lines were allocated to 2 homogeneous subgroups 2 wk after lambing: one group (NEB) received an energy-restricted diet to cover 60% of their energy requirements, and the other group received a control (positive energy balance: PEB) diet. Both diets met the protein requirements. After 10 d on either the NEB or PEB diet, all ewes were injected with a Pam3CSK4/MDP solution in one half-udder to induce an inflammatory response. The ewes were monitored for milk production, somatic cell count (SCC), body weight (BW), body condition score (BCS), and blood metabolites. Differential milk cell counts were determined by flow cytometry. Plasma concentrations of glucose, insulin, nonesterified fatty acids (NEFA), β-hydroxybutyrate (BHB), and triiodothyronine were determined. Energy restriction resulted in an increased fat:protein ratio in milk and decreased milk yield, BW, and BCS. The NEB ewes had significantly higher NEFA and BHB and lower plasma glucose concentrations than PEB ewes, reflecting a mobilization of body reserves and ketone body synthesis. High-SCS ewes had a higher SCS than low-SCS throughout the experiment, except after the inflammatory challenge, which resulted in similar SCS in all 4 groups. A noteworthy interaction between genetic background and diet was evidenced on metabolic parameters and BW. Indeed, high-SCS ewes subjected to NEB showed greater decrease in BW and increased NEFA and BHB concentrations compared with low-SCS ewes. Thus, NEB in early lactation led to extensive mobilization of body reserves and intense ketone body synthesis in mastitis-susceptible sheep. These results reinforce the hypothesis of a genetic association between mastitis susceptibility and energy metabolism and open the way to further studies on the biological basis for this association.
Key words: mastitis susceptibility, negative energy balance, dairy ruminant

INTRODUCTION

Mastitis is considered the most frequent and costly disease of dairy cattle (Barkema et al., 2009) and sheep (Bergonier et al., 2003), which makes it one of the major concerns in dairy production. The highly successful selection for milk production achieved over recent decades has led to a poorer mastitis resistance (Heringstad et al., 2005). Thus, genetic improvement might be a useful option for diminishing mastitis frequency. In this context, we developed a divergent breeding protocol in Lacaune dairy sheep based on extreme values of log-transformed SCC (Rupp et al., 2009). Measurements of the frequency and duration of bacteria in milk (Rupp et al., 2009) showed that low-SCS and high-SCS ewes have lower and higher rate of IMI in natural conditions, respectively. Additionally, bacteriological titer after experimental challenge (Bonnefont et al., 2011) in the 2 genetic lines (high vs. low SCS) demonstrated that bacterial clearance is more efficient in low-SCS ewes

Received May 6, 2015.
Accepted August 9, 2015.
[1]These authors contributed equally to this work.
[2]These authors share senior authorship.
[3]Corresponding author: rachel.rupp@toulouse.inra.fr

than in the high-SCS ewes. Accordingly, low-SCS and high-SCS ewes were further defined as high- and low-resistant sheep.

Increased susceptibility to mastitis during the peripartum period has been widely documented, as reviewed by Mallard et al. (1998). The potential role of a functional link between the immune and endocrine systems during the peripartum period has been mentioned. Dairy cattle experiencing a severe negative energy balance (**NEB**) are considered to be more susceptible to mastitis (Suriyasathaporn et al., 2000; Goff, 2006). Some degree of NEB can be expected during the periparturient period due to the increased energy required to support lactation coupled with a reduced feed intake (Drackley, 1999), especially in high milk-producing animals. The severity and duration of NEB associated with early lactation lead to extensive mobilization of FA from the adipose tissue and result in higher blood nonesterified fatty acids (**NEFA**) or BHB concentrations, or both (Dann et al., 2006).

Several studies have reported an impairment of immune functions in response to increased concentrations of FA and ketone bodies in vitro. The phagocytic and bactericidal capacities of polymorphonuclear neutrophils (PMNL) in vitro are impaired by ketone body concentrations similar to those observed around parturition (Suriyasathaporn et al., 1999). Moreover, Scalia et al. (2006) showed that high concentrations of NEFA reduced bovine PMNL viability in vitro. However, the mechanisms behind the relationship between energy balance and immune function in vivo remain unclear.

Although large-scale studies demonstrated an association between NEFA and BHB and the risk of mastitis during early lactation (Jánosi et al., 2003; Nyman et al., 2008), no firm conclusions could be drawn from studies based on diet-induced NEB models. For instance, Moyes et al. (2009) fed mid lactation cows with either 60% of their maintenance requirements or ad libitum. Diet had no effect on the chemotaxis of blood neutrophils and only a slight effect on phagocytosis capability.

Several studies have reported positive genetic associations between mastitis and ketosis (Heringstad et al., 2005; Zwald et al., 2004). Moreover, Koeck et al. (2014) recently showed that a lower BHB during the early stages of lactation was genetically associated with less frequent clinical ketosis (genetic correlation = 0.48) and lower SCC (Pearson correlations with EBV = 0.11). Altogether, these studies support a biological and genetic association between mastitis and metabolic diseases in early lactation. However, to our knowledge, the direct relationship between early lactation NEB and genetic predisposition to mastitis has never been investigated in vivo. Hence, our model of divergent genetic lines provides a unique opportunity to examine the response of ewes with contrasting genetic backgrounds in mastitis susceptibility to metabolic stress. Our objective was therefore to determine the consequences of experimentally induced NEB during early lactation on production traits and metabolic response in 2 divergent genetic lines, respectively selected for either enhanced or reduced resistance to mastitis.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out following the procedures approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of Toulouse (France), Agreement 01557/01.

Animals

Forty-eight primiparous Lacaune ewes bred at the INRA experimental facility of La Fage (UE321, Roquefort, France) were used for the study. They were enrolled 5 wk before their first lambing until 1 mo after lambing. They belonged to the 2 genetic lines, high and low SCS, divergently selected as described in Rupp et al. (2009). Briefly, the ewes were obtained by one-generation divergent selection of French Lacaune dairy ewes based on dams and progeny-tested rams selected for extreme breeding values for log-transformed SCC. Previous studies had shown that low-SCS ewes are characterized by higher mastitis resistance than high-SCS ewes (Rupp et al., 2009). Ewes in both genetic lines (high vs. low SCS) were housed together in the same facility and managed identically. After lambing, the ewes were left with their lamb for 24 h to allow colostrum consumption. After 24 h, the lambs were removed and fed a milk replacer. The ewes were then machine-milked together, in no predefined milking order, twice a day (0800 and 1700 h) and had free access to water. The bedding before lambing was straw and wood shavings thereafter.

Experimental Design and Diets

A preliminary phase was instigated 5 wk before lambing to adapt the ewes to the diet and individual feeding system. This system was electronically controlled to allow access of each animal to its correct place and to measure the refused feed. As shown in Figure 1, the experiment per se consisted of 4 phases: a postlambing adjustment period, an energy restriction period, an inflammatory challenge period, and a postrestriction period. Phase 1 consisted of a 2-wk period of adjustment after lambing during which individual measurements were taken to calculate the amount of feed to be

Etude 1

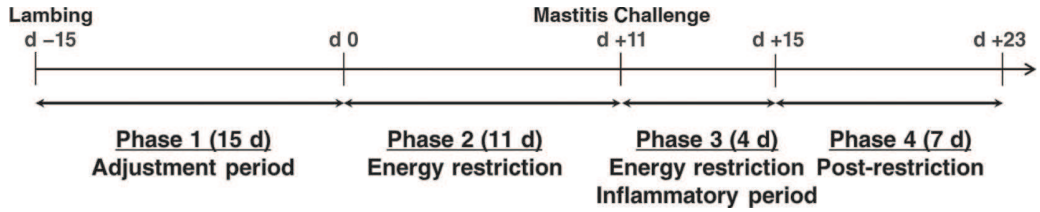


Figure 1. Experiment timeline.

offered thereafter and to constitute the experimental groups. These groups were based on the genetic line (high-SCS or low-SCS) and diet, namely NEB ewes, which were restricted during phases 2 and 3, and those which received a control diet to ensure a positive energy balance: **PEB** ewes. The ewes were randomly assigned to either the NEB or PEB groups to obtain 4 balanced groups of 12 ewes according to milk yield, milk composition, BW, and litter size: high-SCS PEB, low-SCS PEB, high-SCS NEB, and low-SCS NEB. Phase 2 consisted of an 11-d period during which a NEB was induced in NEB ewes by decreasing the energy supply. Ewes in the NEB group received 60% of their energy requirements and 100% of their protein requirements, calculated from the individual data collected in phase 1. The first day of restriction was referred to as d 0 in the experiment timeline. Phase 3 consisted of a 4-d period, starting on d 11, during which all ewes received a mammary injection of a mixed Pam3CSK4/Muramyl Dipeptide (**MDP**) solution to induce local inflammation. The NEB and PEB diets were maintained during this challenge phase. During phase 4, the NEB ewes were progressively returned to a control diet, which was achieved 5 d later.

After lambing, the ewes received 2.93 kg/d of TMR (Table 1) given in 2 equal meals at 0900 and 1630 h, and 0.4 kg/d of barley distributed during the 2 milking periods. This control diet was designed to allow ad libitum intake and full coverage of energy and protein requirements (Hassoun and Bocquier, 2014). During phases 2 and 3, the barley distributed at the milking parlor for the NEB ewes was replaced by 0.4 kg/d of protein supplement (Brebitanne, RAGT, Albi, France) and the amount of TMR was individually adjusted so that the TMR plus protein supplement met either 60% or more than 100% of the energy and protein requirements, respectively. The amounts of TMR were not readjusted during phases 2 and 3. These requirements were calculated from the individual production and BW data obtained during phase 1 and the amount of TMR given to NEB ewes remained unchanged throughout the entire energy restriction phase. On average, NEB ewes consumed 1.51 kg/d of TMR (ranging from 0.7 to 1.9 kg) during the restriction phase.

Energy Requirement and Energy Balance Calculation

For each ewe, the DMI was calculated from the offered feed minus the refused feed, as measured by the individual feeding system, and the energy requirement was calculated at d −8, −7, −6, −2, and −1 according to Hassoun and Bocquier (2014), taking into account milk production and composition. Energy balance was calculated as

$$\text{EB} = (\text{DMI} \times \text{NE}_\text{L}\text{c} - \text{energy requirement})/\text{energy requirement} \times 100.$$

where NE_Lc is the net energy content of the diet.

Intramammary Challenge with Pam3CSK4/MDP

A sterile solution of Pam3CSK4 (10 μg/mL, InVivogen, Toulouse, France) and MDP (10 μg/mL, InVivogen) was prepared in PBS (Life Technologies SAS, Saint Aubin, France) containing 0.1% ovalbumin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). The solution was filter-sterilized and stored at 4°C until injection. On d 11 of the restriction phase, the healthiest half-udder was chosen during the morning milking according to the SCS and emptied manually. The tips

Table 1. Nutrient composition of feed

Nutrient (DM basis)	Lactation TMR[1]	Barley	Protein supplement
CP (%)	16.3	12.7	45.8
Crude fat (%)	3.4	4.2	2.8
Ash (%)	11.9	2.4	7.2
Starch (%)	2.8	55.9	0.1
NDF (%)	39.9	22.5	20.6
ADF (%)	26.7	5.9	12.5
P (%)	0.40	0.5	0.8
NE_L (Mcal/kg)	1.23	1.90	1.96
Ca (%)	1.36	0.1	0.6

[1]Contained (% as fed) 79.5% dehydrated alfalfa, 2.2% extruded linseed, 8.25% common wheat, 5% cane molasses, 3.6% rapeseed, 1% sodium bicarbonate, 0.2% sodium chloride.

of the teats were disinfected twice with a compress containing 70% alcohol. The teat canals were catheterized before injection of 1 mL of the Pam3CSK4/MDP solution. Immediately after injection, the cannula was removed and the udder was massaged to facilitate diffusion of the injected solution.

Milk Production Traits and SCS

Milk yield, fat, and protein contents and SCC were measured 4 times a week, twice per day, from samples collected during the morning and evening milkings. All analyses were performed with a Fossmatic cell counter (Foss, Nanterre, France) at the Interprofessional Milk Analysis Laboratory (Aurillac, France). Daily values of SCC, fat and protein yields, and fat and protein contents were then calculated as the average of the morning and evening milking values. The average SCC, fat content, and protein content were weighed by milk yield. The daily fat-to-protein ratio (**F:P**) was calculated from the daily averages for fat and protein contents. The data were then normalized by log-transforming the daily SCC to a daily SCS as follows: SCS = 3 + log2 (SCC/100,000; Shook, 2006). A reference milk production (**MILKREF**) was then calculated, for each ewe, as the average of the last 3 milk yields recorded during phase 1 (i.e., during the second week after lambing). In addition, half-udder foremilk samples were collected from each ewe and used to measure SCC at d 7, 11, 12, 13, and 14 in the morning and at d 11 in the evening to determine the mammary inflammatory response around the challenge in the injected versus noninjected half-udders.

Weight and BCS

Ewes were weighed on d −1, 1, 4, 6, 8, 12, 14, and 22. The reference BW was defined as the BW measured on d −1. For the restriction period, the BW was corrected in NEB ewes by adding their average decrease in BW between d −1 and d 1 (3.3 kg) to compensate for the decrease in digestive tract contents due to the lower DMI.

Body condition score was assessed once per phase on d −1, 6, 14, and 22 using the 5-point scale proposed by Russel et al. (1969).

Blood Metabolites

Blood samples were collected by jugular venipuncture on d −3, 11, 14, and 21 before the morning milking. Samples were drawn from each ewe into blood collection tubes (6 mL, BD Vacutainer; Venosafe Vacutainer Systems, Terumo Europe N.V., Leuven, Belgium) containing EDTA-K2 or heparin for plasma and were immediately placed on ice before centrifugation at 3,500 × *g* for 15 min at 4°C. The plasma was harvested and stored at −20°C in individual identified aliquots (300 μL) until the analyses of each metabolite. Samples collected on EDTA were used for BHB determination, whereas samples collected on heparin were used to measure insulin, NEFA, and glucose concentrations. Plasma BHB concentration was measured in duplicate using the enzymatic method described by Williamson and Mellanby (1974). Plasma NEFA concentration was measured in duplicate using the commercially available Wako NEFA-HR2 R1 and R2 kits (Laboratoires Sobioda SAS, Montbonnot, Saint Martin, France) adapted for 96-well microplates. Plasma glucose concentration was measured in duplicate using a commercially available BioMerieux kit (reference 61,269/70; Craponne, France) adapted for 96-well microplates. Plasma insulin concentration was measured in duplicate using the protocol of a commercially available RIA kit (Insulin-CT; MP Biomedicals, Orangeburg, NY). Plasma triiodothyronine (**T3**) was measured using the protocol of a commercially available RIA kit (Coat-A-Count Total T3; Siemens Healthcare Diagnostic Inc., Los Angeles, CA). For statistical analyses, the BHB, NEFA, T3, and insulin data were log-transformed to normalize the data distributions.

Flow Cytometry Differential Cell Counts in Milk

For the differential cell counts before and during the inflammatory challenge, milk samples were collected on d 7, 11, 12, 13, and 14 in the morning and on d 11 in the evening. Milk samples were collected 1:1 vol:vol in Alveser's solution and centrifuged at 800 × *g* for 15 min at 4°C. The pellet was washed twice in PBS, 20 m*M* EDTA, and 20% Alsever's solution, suspended in HBSS and filtered through a 40-μm cell strainer. The cells were then incubated with 5 μ*M* SYTO 13 and 5 μ*M* Vybrant DyeCycle Ruby stain (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in HBSS for 30 min in the dark at room temperature. Flow cytometry measurements were done with a MACSQuant cytometer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Data were analyzed using FlowJo software (TreeStar, San Carlos, CA). Positive DNA events were gated based on Vybrant DyeCycle Ruby stain intensity and the cell types determined by side scatter and SYTO-13 labeling. The total PMNL, dead PMNL, and lymphocytes yields in milk were then calculated by multiplying the percentages by the half-udder SCC. For statistical analyses, the values were log-transformed to normalize the data distributions.

Statistical Analysis

Linear mixed models (PROC MIXED, SAS) were used to determine the effects of genetic line (high SCS vs. low SCS) and diet (NEB vs. PEB) on the repeated continuous traits, namely test day milk production traits, SCS, BW, BCS, and blood metabolites. For milk yield and BW, the traits were analyzed as a variation from the reference value, i.e., MILKREF and reference BW, respectively, to allow correction for the initial variation between animals and groups. The data were analyzed separately during the 4 periods (i.e., the postlambing adjustment period, the energy restriction period, the inflammation challenge period, and the postrestriction period). The models applied to all the traits were regression models and could be written in a general form as follows:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\mathbf{a} + \mathbf{e}, \quad [1]$$

where $\mathbf{y}$ is the vector of measures for test day fat and protein contents, fat and protein yields, F:P ratio, SCS, test day variation of milk yield, BW, BCS, log NEFA, log BHB, glucose, log insulin, and log T3; $\boldsymbol{\beta}$ is the vector of fixed effects; $\mathbf{a}$ is the random animal effect; and $\mathbf{e}$ is the random vector of residual effects. $\mathbf{X}$ and $\mathbf{Z}$ are the incidence matrices linking the phenotypic measurements to fixed effects $\boldsymbol{\beta}$ and subjects $\mathbf{a}$, respectively. It is assumed that $\mathbf{a} \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{G})$, where $\mathbf{G}$ is the subject covariance matrix, and $\mathbf{e} \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{R})$, where $\mathbf{R}$ is the residual covariance matrix. Accordingly, $\text{var}(\mathbf{y}) = \mathbf{ZGZ}' + \mathbf{R}$. To account for any correlation of measures within subjects (longitudinal recording), a first-order autoregressive covariance structure was fitted to the residuals (R), as proposed by Robert-Granie et al. (2004). The following fixed effects were tested: genetic line (high SCS vs. low SCS), diet (NEB vs. PEB), litter size, sampling time point, and MILKREF. The models were first fitted without interaction terms, and then all interactions between these factors were tested. For dependent variables where only one record was available per period (i.e., for blood metabolites and BCS), the random animal effect and covariance structure of residuals were removed from the model. For repeated data obtained around the inflammatory challenge, the test day half-udder SCS, log PMNL, log dead PMNL, and log lymphocytes measured from d −4 before challenge to 48 h after challenge (n = 5) were analyzed simultaneously, using a mixed model of the general form [equation 1]. Analyses were conducted separately by half-udder (i.e., injected versus controls). Statistical differences were declared as significant or highly significant at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

RESULTS

Energy Balance

The individual energy balance was determined from the feed consumption and milk production traits. Figure 2 shows the average energy balance according to genetic line (high vs. low SCS) and diet (NEB vs. PEB) during the experiment. As expected, the average energy balance of NEB ewes was close to 60% of their requirements during phases 2 and 3 and significantly lower than that of PEB ewes. Noteworthy, the energy balance remained stable throughout phases 2 and 3 even though the amounts of TMR provided were not readjusted after d 0.

Milk Production Traits

The effects of genetic line (high vs. low SCS) and diet (NEB vs. PEB) on milk yield variation and F:P ratio are presented in Table 2 and illustrated with raw data in Figure 3. Milk yield was lower in NEB ewes than in PEB ewes (Figure 3A, Table 2) during phase 2 ($P < 0.0001$, LSM −13.35%), phase 3 ($P < 0.0001$, LSM −24.45%), and phase 4 ($P < 0.001$, LSM −14.47%). Diet also had a significant effect on milk composition. For example, the F:P ratio was 35% higher in NEB ewes during energy restriction (Figure 3B, Table2) and the difference between NEB and PEB ewes was highly significant ($P < 0.0001$). Results for average protein content, fat content, protein yield and fat yield, according to genetic line and diet, are shown in the

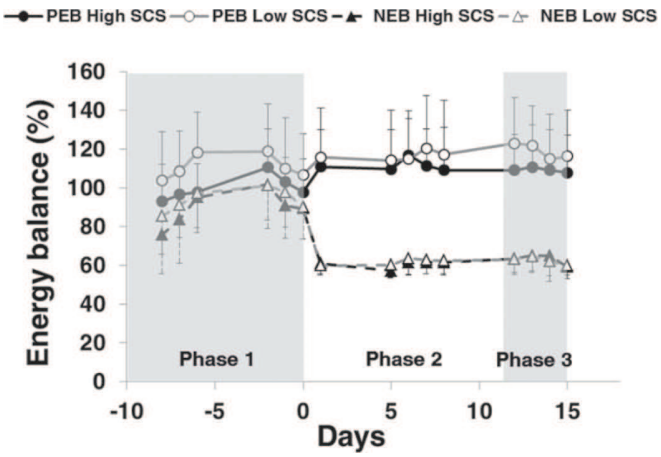


Figure 2. Energy balance in 12 high-SCS (▲) and 12 low-SCS (Δ) ewes in negative energy balance (NEB) and 12 high-SCS (●) and 12 low-SCS (○) ewes in positive energy balance (PEB). Time points are relative to the first day of energy restriction (d 0). Error bars indicate standard error.

Table 2. Analysis of variance (generalized logistic mixed model) of the effect of genetic line [positive vs. negative energy balance (high vs. low SCS)], diet (PEB vs. NEB), and their interaction on different traits measured in 12 high-SCS and 12 low-SCS ewes in NEB and 12 high-SCS and 12 low-SCS ewes in PEB[1]

Trait	Effect	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4
Milk yield variation	Genetic line (high vs. low SCS)				
	Diet (NEB vs. PEB)		***	***	***
	Genetic line × diet interaction				
F:P[2]	Genetic line (high vs. low SCS)				
	Diet (NEB vs. PEB)		***	***	
	Genetic line × diet interaction				
Weight variation	Genetic line (high vs. low SCS)	NA[3]			
	Diet (NEB vs. PEB)	NA	**	***	***
	Genetic line × diet interaction	NA		*	
BCS	Genetic line (high vs. low SCS)				
	Diet (NEB vs. PEB)		**	*	
	Genetic line × diet interaction				
Log BHB	Genetic line (high vs. low SCS)				
	Diet (NEB vs. PEB)		***	*	
	Genetic line × diet interaction		***	***	*
Log NEFA	Genetic line (high vs. low SCS)				
	Diet (NEB vs. PEB)		***	***	
	Genetic line × diet interaction		**		*
Glucose	Genetic line (high vs. low SCS)	*		*	
	Diet (NEB vs. PEB)		**	**	
	Genetic line × diet interaction				
Log insulin	Genetic line (high vs. low SCS)				
	Diet (NEB vs. PEB)				
	Genetic line × diet interaction				
SCS	Genetic line (high vs. low SCS)	***	***		***
	Diet (NEB vs. PEB)				*
	Genetic line × diet interaction				

[1]The four different phases are described in Figure 1. For all traits and in each period of the experiment, the 3 effects were tested; significant effects were highlighted by asterisks. Significance levels for genetic line and diet were from models without interaction terms.

[2]F:P = fat-to-protein ratio.

[3]Not analyzed in phase 1 (reference BW).

*$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$.

Supplemental Figure S1 (http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9785). Neither the genetic line nor the genetic line × diet interaction had a significant effect on milk yield or the F:P ratio during the experiment (Table 2).

BW and BCS

Figure 4 shows the variation in BW and BCS during the experiment, according to genetic line (high vs. low SCS) and diet (NEB vs. PEB). Feed restriction decreased BW (Figure 4A) and BCS (Figure 4B) by −4.3 and −4.9%, respectively, compared with the control diet. The NEB ewes had a lower BW throughout phase 2 ($P < 0.01$), phase 3 ($P < 0.0001$), and phase 4 ($P < 0.0001$) and a lower BCS during phase 2 ($P < 0.01$) and phase 3 ($P < 0.05$), compared with PEB ewes (Table 2). The genetic line did not have any significant effect on BW variation or BCS during the experiment. However, BW was significantly affected by the genetic line × diet interaction during phase 3 ($P < 0.05$, Table 2). In the NEB groups, BW loss was significantly higher in the high-SCS line (LSM −6.14%) than in the low-SCS genetic line (LSM −4.02%), whereas in the PEB groups, BW variation was limited in ewes from both low and high-SCS genetic lines. Although the genetic line × diet interaction was not significant in phase 4, high-SCS line ewes still displayed a lower BW after the restriction challenge.

Blood Metabolites

The plasma concentrations of NEFA, BHB, glucose, and insulin are shown in Figure 5. Feed restriction increased the NEFA and BHB concentrations by 97 and 42%, respectively, and decreased the glucose concentration by up to −9% (Figures 5A, 5B, and 5C, respectively), compared with the control diet. Therefore, NEB ewes had higher plasma NEFA and BHB concentrations than PEB ewes (Table 2) during phase 2 ($P < 0.0001$ and $P < 0.001$, respectively) and phase 3 ($P < 0.0001$ and $P < 0.05$, respectively). Glucose concentration was significantly lower in NEB ewes than in PEB ewes during the restriction phases ($P < 0.001$). Despite the difference in glucose concentration observed between NEB and PEB ewes, no significant difference between the groups was observed for insulin

Etude 1

concentration during the restriction phases (Figure 5D, Table 2). Nor was any significant difference observed between the groups at any point for T3 (Supplemental Figure S1 and Table S1; http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9785).

Glucose was the only metabolite tested for which the concentration was affected by genetic line (high vs. low SCS). Indeed, glucose concentration was higher in low-SCS ewes than in high-SCS ewes (Figure 5C) and the difference was significant during phase 1 ($P < 0.05$, Table 2) and phase 3 ($P < 0.05$, Table 2). Importantly, the statistical analysis (Table 2) revealed a significant genetic line × diet interaction for NEFA (Figure 5A) and BHB (Figure 5B) concentrations during phase 2 ($P < 0.01$ and $P = 0.0001$, respectively, Table 2). The interaction was still significant during phase 3 for BHB concentration ($P < 0.001$) and remained a tendency for NEFA concentration ($P = 0.09$). High-SCS NEB ewes had higher BHB and NEFA concentrations than low-SCS NEB ewes, whereas BHB concentrations in both low and high-SCS PEB groups remained similar throughout the experiment. The interactions for both NEFA and BHB concentrations were still significant during phase 4.

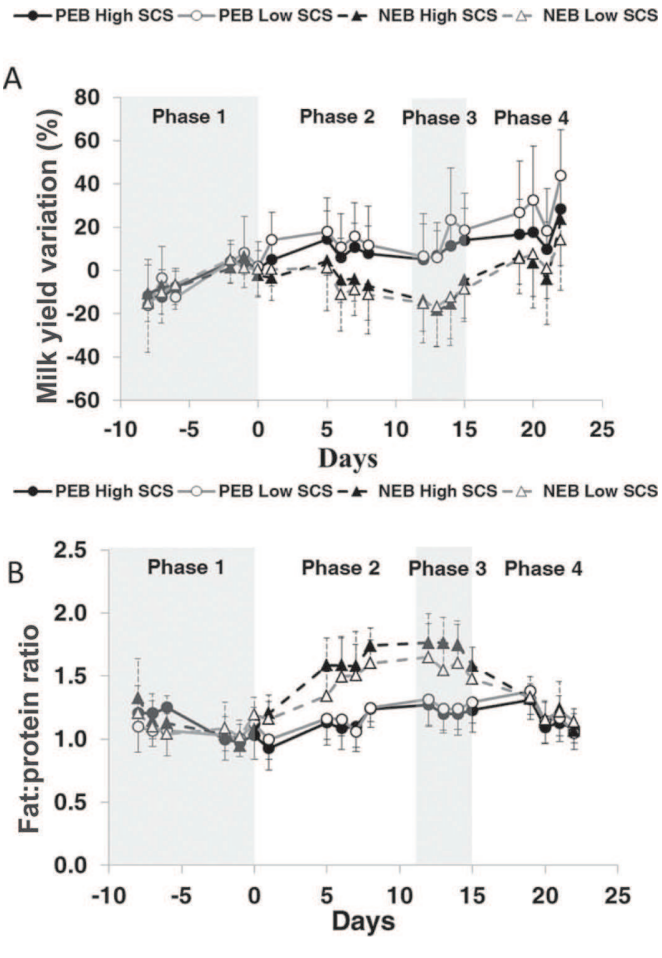


Figure 3. Milk yield variation relative to the arithmetic mean of the last 3 milk yields recorded during phase 1 (A) and fat:protein ratio (B) in 12 high-SCS (▲) and 12 low-SCS (Δ) ewes in negative energy balance (NEB) and 12 high-SCS (●) and 12 low-SCS (○) ewes in positive energy balance (PEB). Time points are relative to the first day of energy restriction (d 0). Error bars indicate standard error.

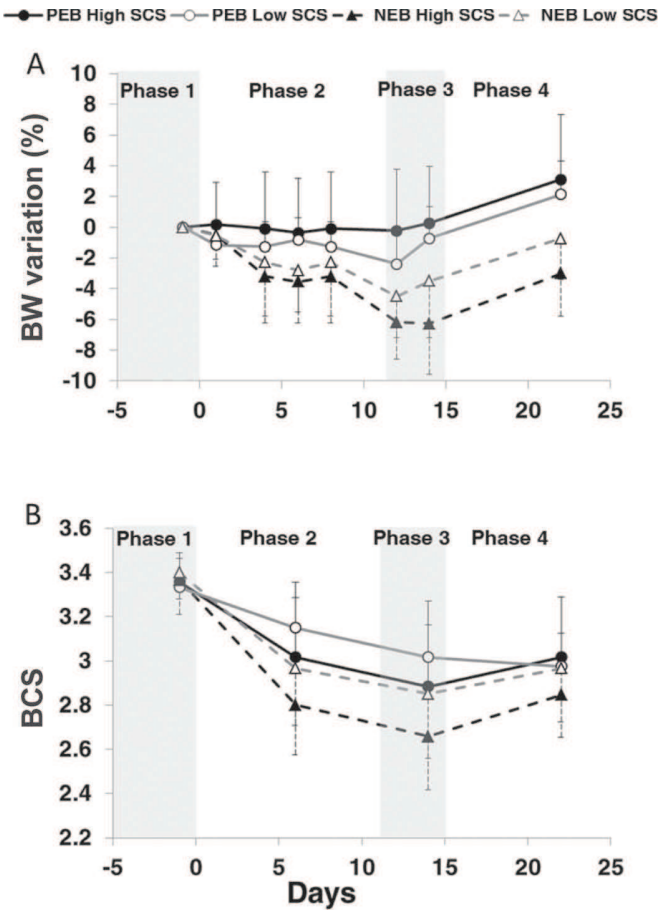


Figure 4. Weight variation relative to d −1 (A) and BCS (B) in 12 high-SCS (▲) and 12 low-SCS (Δ) ewes in negative energy balance (NEB) and 12 high-SCS (●) and 12 low-SCS (○) ewes in positive energy balance (PEB). Time points are relative to the first day of energy restriction (d 0). Body weight of NEB ewes was corrected for the decrease in digestive contents during phases 2 and 3. Error bars indicate standard error.

Mammary Inflammation

One ewe showed local and general signs of mastitis on d 14; therefore, the data collected from the ewe in phases 3 and 4 were discarded from the statistical analysis. Three out of the 48 injected half-udders presented higher SCS (between 3.5 and 4.5) before the inflammatory challenge. These half-udders were retained for

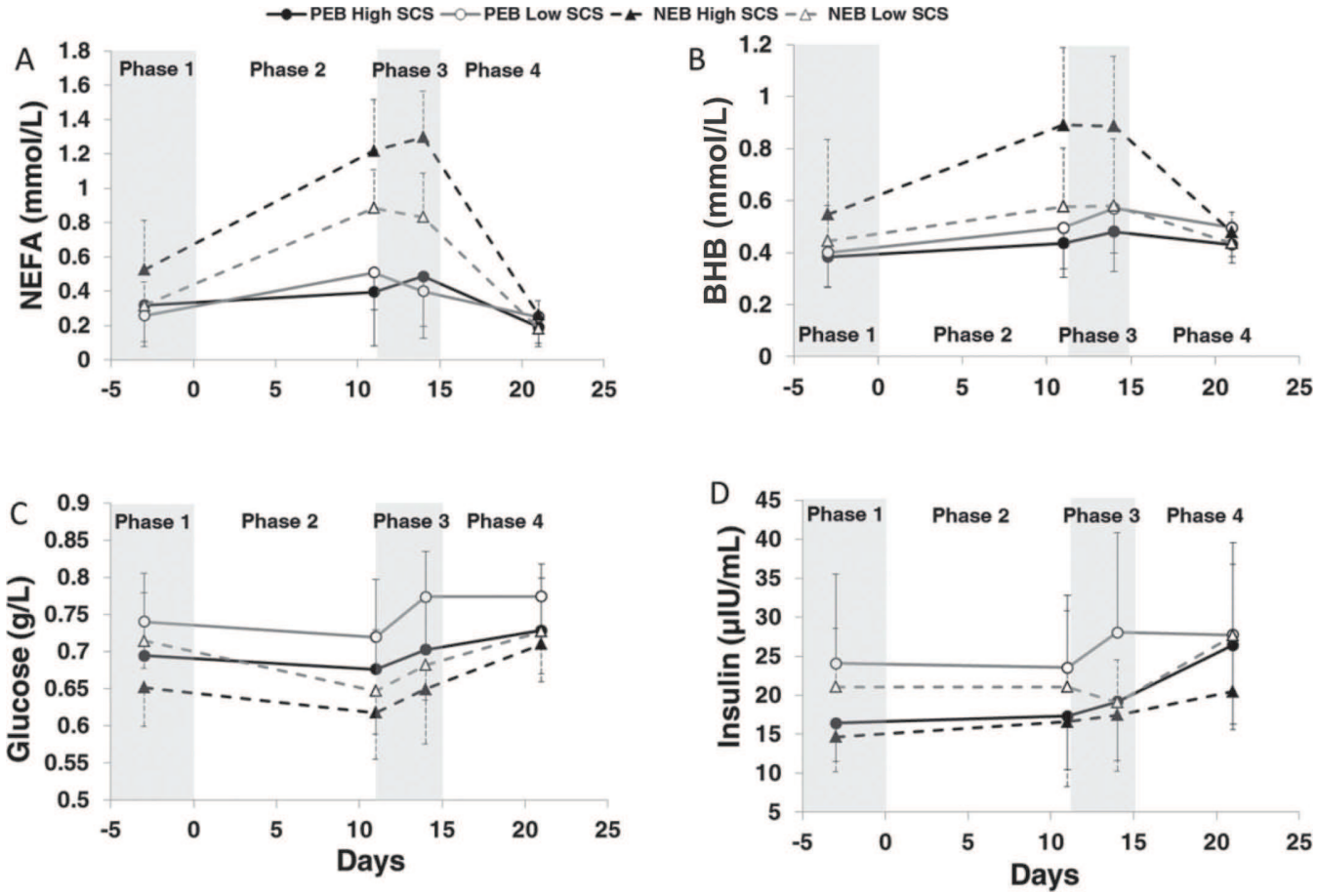


Figure 5. Plasma concentrations of nonesterified fatty acids (NEFA; A), BHB (B), glucose (C), and insulin (D) in 12 high-SCS (▲) and 12 low-SCS (Δ) ewes in negative energy balance (NEB) and 12 high-SCS (●) and 12 low-SCS (○) ewes in positive energy balance (PEB). Time points are relative to the first day of energy restriction (d 0). Error bars indicate standard error.

analysis because the inflammatory challenge induced an intense and strong inflammatory response (average SCS of 9.8 in the injected half-udder), well above the residual inflammation linked to chronic infection.

Figure 6 shows SCS during the experiment according to genetic line (high vs. low SCS) and diet (NEB vs. PEB). Ewes receiving the NEB diet had an unexpected lower SCS than PEB ewes during phase 4 ($P < 0.05$, LSM −14.7%). Statistical analysis (Table 2) showed that high-SCS ewes had a higher SCS than low-SCS ewes in phases 1, 2, and 4. However, genetic line had no significant effect on SCS during phase 3. Indeed, similar SCS values were obtained for both genetic lines during the inflammatory challenge. No genetic line × diet interaction was observed for whole-udder milk SCS during the experiment.

The SCS, lymphocytes, PMNL, and dead PMNL counts in both injected and control half-udders were scrutinized once during phase 2 and 4 times during

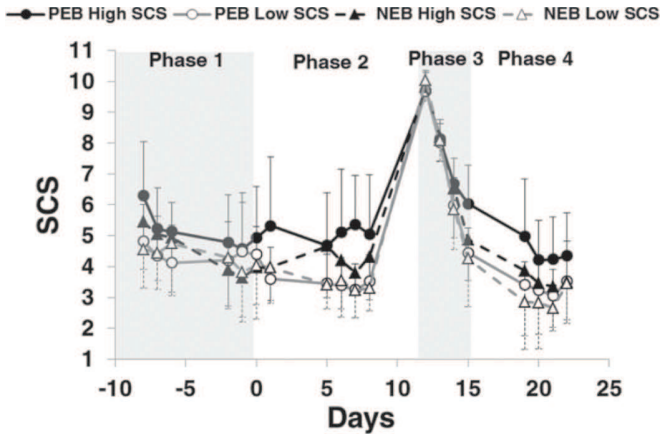


Figure 6. The SCS in 12 high-SCS (▲) and 12 low-SCS (Δ) ewes in negative energy balance (NEB) and 12 high-SCS (●) and 12 low-SCS (○) ewes in positive energy balance (PEB). Time points are relative to the first day of energy restriction (d 0). Mastitis challenge was administered at d 11. Error bars indicate standard error.

Etude 1

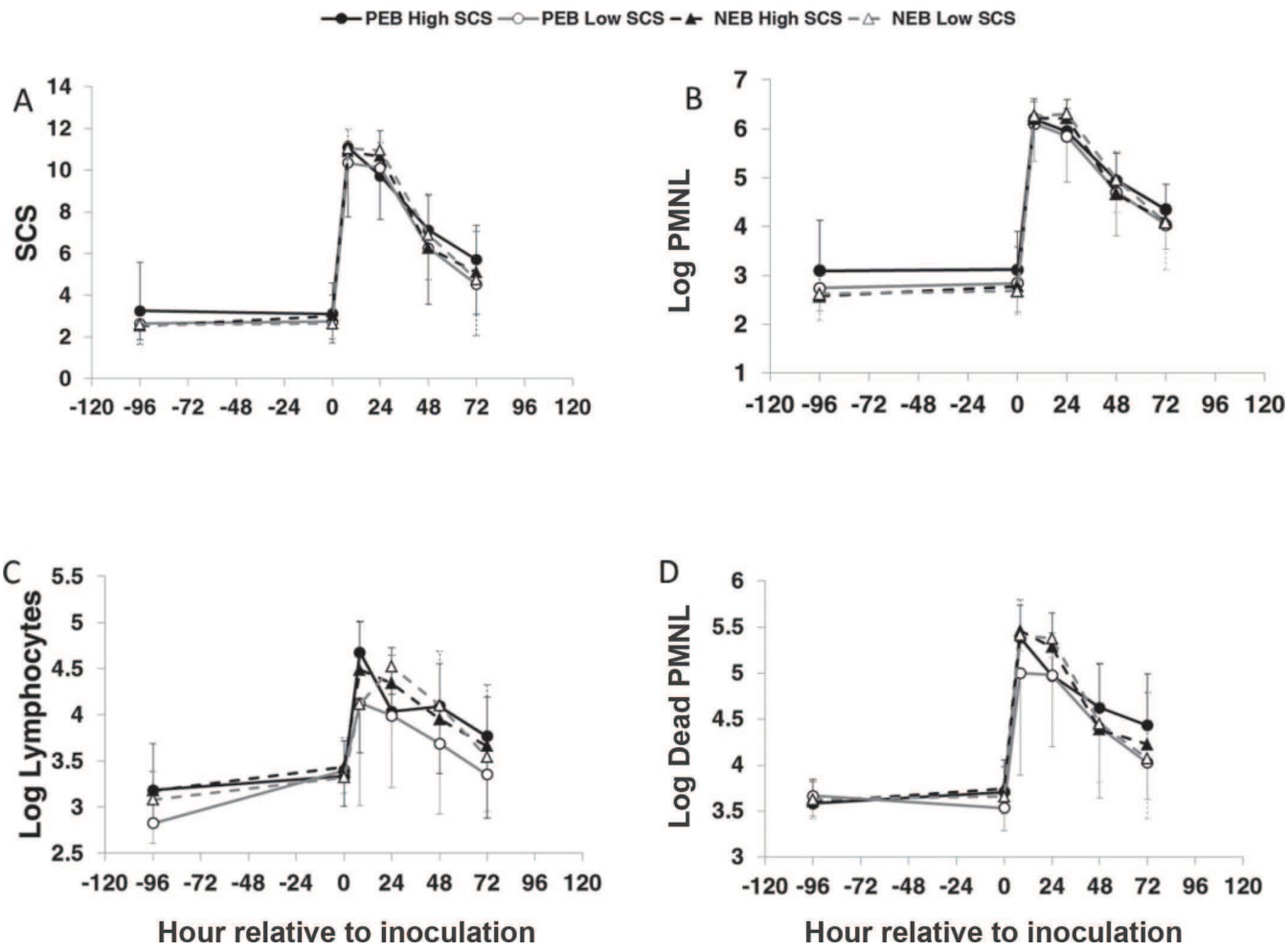


Figure 7. The SCS (A), log polymorphonuclear neutrophils (PMNL; B), log lymphocytes (C), and log dead PMNL (D) in injected half-udder of 12 high-SCS (▲) and 12 low-SCS (Δ) ewes in negative energy balance (NEB) and 12 high-SCS (●) and 12 low-SCS (○) ewes in positive energy balance (PEB). Time points are relative to the hour of injection. Error bars indicate standard error.

phase 3. Neither diet nor genetic line × diet interaction had any significant effect on SCS, lymphocytes, PMNL, or dead PMNL counts in noninjected half-udders, as shown in Supplemental Figure S2 (http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9785). However, the noninjected half-udders of high-SCS ewes had higher SCS, lymphocytes, PMNL, and dead PMNL counts than those of low-SCS ewes (Supplemental Table S2; http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9785).

The SCS, lymphocytes, PMNL, and dead PMNL counts in the injected half-udders of all ewes increased at 8 h postinjection then decreased between 24 and 72 h. The effect of diet (NEB vs. PEB) on the injected half-udder was significant for dead PMNL counts (Figure 7B, $P < 0.05$) but only had a tendency for lymphocyte counts (Figure 7C, $P = 0.06$). Indeed, NEB ewes had slightly higher dead PMNL counts and lymphocytes counts than PEB ewes (+3.2 and +3.6%, respectively). However, no difference was observed between the injected half-udders of PEB and NEB ewes for SCS (Figure 7A) or PMNL (Figure 7D).

The effect of genetic line (high vs. low SCS) was not significant for SCS, PMNL, or dead PMNL counts in the injected half-udder during the 48 h postinjection. However, high-SCS ewes had a higher lymphocytes count than low-SCS ewes (+4%). The genetic line × diet interaction did not significantly affect SCS, lymphocytes, PMNL, or dead PMNL counts in the injected half-udder during the 48 h postinjection.

DISCUSSION

Consequences of a Dietary-Induced NEB in Ewes

As expected, reducing the energy supply in lactating ewes resulted in an average energy balance of approxi-

mately 60% and produced conditions closely related to metabolic impairment during early lactation in dairy cattle (Rastani et al., 2001).

In the present study, restriction led to a decrease in milk yield as reported in Gross et al. (2011), who studied energy-restricted Holstein cows with a similarly induced NEB during mid lactation. In their study, the decline in milk yield during restriction was only about 10%, whereas it was 25% in NEB ewes in our study. The selection for higher milk production achieved over recent decades in Holstein cows, and to some extent in Lacaune dairy sheep, has probably resulted in greater homeorhetic control of metabolism to ensure that endogenous and dietary nutrients are directed to the mammary gland for lactogenesis. This might explain a moderate decrease in milk production despite the persistence of induced NEB. As in Gross et al. (2011), F:P ratio increased during restriction in NEB ewes. This difference was due to a decrease in milk protein content and an increase in fat content.

Decrease in BW is mainly due to the mobilization of adipose tissue during early lactation. In the present study, BW was corrected to ensure that the measured BW loss was not due to the decreased weight of the digestive tract contents. The decline in ewe BW during the deliberately induced NEB in the present study was only 4.3% in contrast to the 8% decrease reported by Gross et al. (2011) where the induced NEB was similar but the BW was not corrected for the decrease in digestive tract contents. Moreover, the fact that the energy restriction period in our study was only 2 wk compared with 3 wk in the study by Gross et al. (2011) might partly explain this difference.

The energy balance remained stable throughout the restriction period, even though the amounts of TMR were not readjusted, and this could be due to the way the energy balance was determined. Indeed, energy balance is dependent on energy requirements and thus on BW, milk yield, and fat and protein contents. Even if milk yield and BW decreased during restriction, the stability of the energy requirements and hence of the energy balance over time could be due to the increase in fat content. Energy restriction in ewes also resulted in significant modifications in the concentrations of blood metabolites, as have already been described in feed-restricted cattle.

The NEB around parturition is known to lead to extensive mobilization of adipose triacylglycerols to meet energy requirements. High concentrations of plasma NEFA are therefore produced from mobilized adipose tissue triacylglycerols that can be taken up by the liver and oxidized to produce ketone bodies (Dann et al., 2006; Goff, 2006). Our study confirmed that energy restriction in ewes was associated with increased plasma NEFA and BHB concentrations during early lactation, in accordance with numerous studies conducted in dairy cows (Suriyasathaporn et al., 2000; Gross et al., 2011). Indeed, in NEB ewes, BHB was higher by 42% and NEFA by 97% than in ewes receiving the control diet. The NEFA and BHB concentrations in our PEB and NEB ewes were similar to those reported by Moyes et al. (2009) in Holstein cows restricted to 60% of their energy requirement. The metabolic profile of primiparous Lacaune sheep, from the same flock used in the present study, had already been determined 1 wk before lambing until the end of lactation (González-García et al., 2015). In the present study, the NEFA and BHB concentrations in PEB ewes remained stable throughout the experiment and averaged 0.3 and 0.5 mmol/l, respectively. In contrast, González-García et al. (2015) reported higher NEFA and BHB concentrations (0.8 and 0.6 mmol/L, respectively) 28 d after lambing. The lower NEFA and BHB concentrations measured in our study could be explained by the fact that the lambs were separated from their dams after colostrum intake, whereas the lambs were suckled in the experiment described by González-García et al. (2015). The 28-d suckling period may indeed have augmented the energy required for lactation and have increased the energy deficit and thus the NEFA and BHB concentrations.

The decrease in plasma glucose concentration resulting from energy restriction was probably due to the smaller amount of propionate produced in the rumen, due to the lower DMI, and the replacement of barley by a protein concentrate to meet protein requirements. Indeed, glycemia was reduced by 8.5% on average in NEB ewes, whereas Moyes et al. (2009) found that NEB induction had no effect on the homeostatic control of blood glucose during mid lactation. However, these authors induced NEB by decreasing the amount of feed but without changing its composition, which affected protein supply but had less effect on starch intake than our restriction method. Despite the significant difference in plasma glucose concentration between NEB and PEB ewes, no difference in plasma insulin concentration was observed during restriction. The insulin concentrations measured in the present experiment were within the range previously reported in primiparous ewes from the same flock (González-García et al., 2015).

Response to the Inflammatory Challenge in Energy-Restricted Ewes

Energy restriction did not modify the intense inflammatory response induced by *Staphylococcus*-associated ligands in our study. Similarly, no difference in milk SCS between NEB and PEB cows was reported during *Streptococcus*-associated mastitis by Moyes et al.

(2009). However, in our study, the dead PMNL counts were slightly but significantly higher in NEB than PEB ewes during the challenge whereas no difference was observed for PMNL counts. This suggests that neutrophil apoptosis might be differently regulated according to energy balance. Such an explanation is in agreement with Piepers and De Vliegher (2013), who reported significantly higher percentages of milk and blood PMNL apoptosis in nonsupplemented cows during the periparturient period (reflecting a potential reduction in innate immune capacity), as compared with cows orally supplemented with medium-chain FA.

Response to the Inflammatory Challenge in Ewes with Different Backgrounds in Mastitis Susceptibility

As expected, high-SCS ewes had higher SCS compared with low-SCS ewes in accordance with Rupp et al. (2009). Monthly SCS measurements provide a good indirect indicator of mastitis. Thus, the different mastitis-susceptibility backgrounds of the 2 genetic lines (high vs. low SCS) were confirmed by their different SCS levels. During the inflammatory challenge, SCS increased sharply in the injected half-udder. As milk SCS mainly reflects the number of neutrophils that migrate from the blood to the mammary gland, the Pam_3CSK_4/MDP combination triggered a strong recruitment. Furthermore, an acute recruitment of neutrophils and lymphocytes in response to the challenge was confirmed by flow cytometry. Surprisingly, no difference for SCS or neutrophils recruitments was observed between the 2 lines. The ability of neutrophils to migrate to the site of infection and engulf invading pathogens is however critical to the efficiency of the innate immune response (Rainard and Riollet, 2006). Thus, the neutrophils from both SCS lines exhibited similar abilities to migrate to the site of inflammation. Consistent with our results, Bonnefont et al. (2011) reported similar SCC in these 2 lines during the 48 h after *Staphylococcus* inoculations even if the bacteriological titer was lower in low-SCS ewes. The 2 SCS lines might display the same neutrophil recruitment kinetics in the mammary gland in response to an invading pathogen, but a difference in functionality, such as phagocytosis and killing abilities, could in turn explain the difference in susceptibility to mastitis. Further studies are necessary to test this hypothesis.

Consequences of a NEB in Ewes with Different Genetic Backgrounds in Mastitis Susceptibility

To our knowledge, this is the first report of a difference in metabolic response to an energy restriction in animals with different genetic backgrounds in mastitis susceptibility. An interesting interaction on metabolic parameters was highlighted between diet and genetic line (high vs. low SCS). High-SCS ewes exhibited a slightly greater decrease in BW and increase in NEFA concentration than low-SCS ewes in response to NEB. As an increase in NEFA concentration reflects a mobilization of adipose tissue, this phenomenon was slightly more intense in high-SCS ewes than in low-SCS ewes. Above all, high-SCS ewes produced much more BHB during energy restriction than low-SCS ewes, which suggests a greater production of ketone bodies or a relative incapacity to use these substrates. According to Suriyasathaporn et al. (2000), insufficient oxaloacetate is available during the hypoglycemic state for synthesis of citrate from acetyl-CoA to enter the TCA cycle. Consequently, acetyl-CoA is removed via ketone body synthesis as long as the energy supply remains deficient. Ketone body synthesis was thus greater in high-SCS than in low-SCS ewes during energy restriction. Moreover, the plasma glucose concentration was slightly lower in high-SCS ewes than in low-SCS ewes before energy restriction and during the inflammatory challenge, which would support the hypothesis that acetyl-CoA accumulation was greater in high-SCS ewes than in low-SCS ewes.

Selection based on extreme breeding values for SCS was associated with a different metabolic response to energy restriction. This finding is in accordance with previous studies that demonstrated positive genetic correlations between mastitis and ketosis (Zwald et al., 2004; Heringstad et al., 2005). Genini et al. (2011) also showed that pathways related to immune response and lipid metabolism were altered in ruminants infected with mammary gland pathogens. Two hypotheses can be formulated in the light of these results. The first hypothesis is that high-SCS ewes may differ from low-SCS ewes in their genetic background for lipid metabolism, resulting in intense NEFA and BHB synthesis during energy restriction. The difference between the 2 metabolisms would lead to the variation in mastitis susceptibility. This hypothesis is supported by Suriyasathaporn et al. (1999), who demonstrated that BHB and NEFA impair immune cell functions in vitro. The second hypothesis is that high-SCS ewes may have higher energy requirements than low-SCS ewes due in part to their higher immune energy expenditure. This would enhance the energy demand, result in greater mobilization of adipose tissue and thereby increase NEFA and BHB synthesis. Glucose is the primary fuel used by bovine leukocytes (Weisdorf et al., 1982), which is consistent with our observations of a higher milk leukocyte count and lower glucose concentration in high-SCS ewes than

in low-SCS ewes. Acetyl-CoA accumulation and BHB synthesis might therefore have been amplified in high-SCS ewes.

Further studies are needed to disentangle these hypotheses and better understand the mechanisms underlying the genetic association between mastitis susceptibility and energy metabolism.

CONCLUSIONS

Induced NEB in lactating ewes yielded similar results to those previously observed in dairy cows. However, to our knowledge, this is the first report of a difference in metabolic response to an energy restriction in ruminants with different genetic backgrounds in mastitis susceptibility. Indeed, mastitis-susceptible ewes showed a greater decrease in BW and higher NEFA and BHB concentrations than mastitis-resistant ewes when subjected to NEB, thus showing the extensive mobilization of body reserves and intense ketone body synthesis occurring in susceptible sheep. These preliminary results reinforce the hypothesis of a genetic association between mastitis susceptibility and energy metabolism, and open the way to further studies on the biological basis of the association between metabolism and immunity. From a population perspective, successful selection to achieve global robustness (healthy and high-yield dairy ruminants) is an issue for livestock, all the more if environmental conditions become more challenging. Our finding suggest that selection for low SCS involves having more robust animals, with potentially fewer metabolic disorders and better response to nutrition challenge. This hypothesis should be addressed in the future.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the RUMINFLAME project, as part of the INRA MetaProgramme Gestion Intégrée de la Santé Animale (INRA, Paris, France). The authors are grateful to Philippe Hassoun (INRA SELMET, Montpellier, France) for his advice on the experiment and for reviewing the paper. In addition, gratitude is extended to Jeremie Gozlan, Claudia Ribeiro, and the technical staff of La Fage experimental farm (Roquefort sur Soulzon, France) for assisting with technical support, animal care, and data collection.

REFERENCES

Barkema, H. W., M. J. Green, A. J. Bradley, and R. N. Zadoks. 2009. Invited review: The role of contagious disease in udder health. J. Dairy Sci. 92:4717–4729. http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2347.

Bergonier, D., R. de Crémoux, R. Rupp, G. Lagriffoul, and X. Berthelot. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. Vet. Res. 34:689–716. http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2003030.

Bonnefont, C. M., M. Toufeer, C. Caubet, E. Foulon, C. Tasca, M.-R. Aurel, D. Bergonier, S. Boullier, C. Robert-Granié, G. Foucras, and R. Rupp. 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. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-12-208.

Dann, H. M., N. B. Litherland, J. P. Underwood, M. Bionaz, A. D'Angelo, J. W. McFadden, and J. K. Drackley. 2006. Diets during far-off and close-up dry periods affect periparturient metabolism and lactation in multiparous cows. J. Dairy Sci. 89:3563–3577. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72396-7.

Drackley, J. K. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? J. Dairy Sci. 82:2259–2273. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75474-3.

Genini, S., B. Badaoui, G. Sclep, S. C. Bishop, D. Waddington, M.-H. Pinard van der Laan, C. Klopp, C. Cabau, H.-M. Seyfert, W. Petzl, K. Jensen, E. J. Glass, A. de Greeff, H. E. Smith, M. A. Smits, I. Olsaker, G. M. Boman, G. Pisoni, P. Moroni, B. Castiglioni, P. Cremonesi, M. Del Corvo, E. Foulon, G. Foucras, R. Rupp, and E. Giuffra. 2011. Strengthening insights into host responses to mastitis infection in ruminants by combining heterogeneous microarray data sources. BMC Genomics 12:225 http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-12-225.

Goff, J. P. 2006. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. J. Dairy Sci. 89:1292–1301. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72197-X.

González-García, E., A. Tesniere, S. Camous, F. Bocquier, F. Barillet, and P. Hassoun. 2015. The effects of parity, litter size, physiological state, and milking frequency on the metabolic profile of Lacaune dairy ewes. Domest. Anim. Endocrinol. 50:32–44. http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2014.07.001.

Gross, J., H. A. van Dorland, R. M. Bruckmaier, and F. J. Schwarz. 2011. Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation. J. Dairy Sci. 94:1820–1830. http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3707.

Hassoun, P., and F. Bocquier. 2014. Alimentation des ovins. Quae, Versailles, France.

Heringstad, B., Y. M. Chang, D. Gianola, and G. Klemetsdal. 2005. Genetic analysis of clinical mastitis, milk fever, ketosis, and retained placenta in three lactations of Norwegian red cows. J. Dairy Sci. 88:3273–3281. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73010-1.

Jánosi, S., M. Kulcsár, P. Kóródi, L. Kátai, J. Reiczigel, S. J. Dieleman, J. A. Nikolic, G. Sályi, P. Ribiczey-Szabó, and G. Huszenicza. 2003. Energy imbalance related predisposition to mastitis in group-fed high-producing postpartum dairy cows. Acta Vet. Hung. 51:409–424. http://dx.doi.org/10.1556/AVet.51.2003.3.14.

Koeck, A., J. Jamrozik, F. S. Schenkel, R. K. Moore, D. M. Lefebvre, D. F. Kelton, and F. Miglior. 2014. Genetic analysis of milk β-hydroxybutyrate and its association with fat-to-protein ratio, body condition score, clinical ketosis, and displaced abomasum in early first lactation of Canadian Holsteins. J. Dairy Sci. 97:7286–7292. http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8405.

Mallard, B. A., J. C. Dekkers, M. J. Ireland, K. E. Leslie, S. Sharif, C. Lacey Vankampen, L. Wagter, and B. N. Wilkie. 1998. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. J. Dairy Sci. 81:585–595. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75612-7.

Moyes, K. M., J. K. Drackley, J. L. Salak-Johnson, D. E. Morin, J. C. Hope, and J. J. Loor. 2009. Dietary-induced negative energy balance has minimal effects on innate immunity during a *Streptococcus uberis* mastitis challenge in dairy cows during mid lactation. J. Dairy Sci. 92:4301–4316. http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2170.

Nyman, A.-K., U. Emanuelson, K. Holtenius, K. L. Ingvartsen, T. Larsen, and K. P. Waller. 2008. Metabolites and immune variables associated with somatic cell counts of primiparous dairy cows. J. Dairy Sci. 91:2996–3009. http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0969.

Etude 1

Piepers, S., and S. De Vliegher. 2013. Oral supplementation of medium-chain fatty acids during the dry period supports the neutrophil viability of peripartum dairy cows. J. Dairy Res. 80:309–318. http://dx.doi.org/10.1017/S0022029913000228.

Rainard, P., and C. Riollet. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. Vet. Res. 37:369–400. http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2006007.

Rastani, R. R., S. M. Andrew, S. A. Zinn, and C. J. Sniffen. 2001. Body composition and estimated tissue energy balance in Jersey and Holstein cows during early lactation. J. Dairy Sci. 84:1201–1209. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74581-X.

Robert-Granie, C., J. Foulley, E. Maza, and R. Rupp. 2004. Statistical analysis of somatic cell scores via mixed model methodology for longitudinal data. Anim. Res. 53:259–273.

Rupp, R., D. Bergonier, S. Dion, M. C. Hygonenq, M. R. Aurel, C. Robert-Granié, and G. Foucras. 2009. Response to somatic cell count-based selection for mastitis resistance in a divergent selection experiment in sheep. J. Dairy Sci. 92:1203–1219. http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1435.

Russel, A. J. F., J. M. Doney, and R. G. Gunn. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. J. Agric. Sci. 72:451–454. http://dx.doi.org/10.1017/S0021859600024874.

Scalia, D., N. Lacetera, U. Bernabucci, K. Demeyere, L. Duchateau, and C. Burvenich. 2006. In vitro effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability. J. Dairy Sci. 89:147–154. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72078-1.

Shook, G. E. 2006. Major advances in determining appropriate selection goals. J. Dairy Sci. 89:1349–1361. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72202-0.

Suriyasathaporn, W., A. J. J. M. Daemen, E. N. Noordhuizen-Stassen, S. J. Dieleman, M. Nielen, and Y. H. Schukken. 1999. β-hydroxybutyrate levels in peripheral blood and ketone bodies supplemented in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes. Vet. Immunol. Immunopathol. 68:177–186. http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00017-3.

Suriyasathaporn, W., C. Heuer, E. N. Noordhuizen-Stassen, and Y. H. Schukken. 2000. Hyperketonemia and the impairment of udder defense: A review. Vet. Res. 31:397–412. http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2000128.

Weisdorf, D. J., P. R. Craddock, and H. S. Jacob. 1982. Granulocytes utilize different energy sources for movement and phagocytosis. Inflammation 6:245–256. http://dx.doi.org/10.1007/BF00916406.

Williamson, D. H., and J. Mellanby. 1974. D-(–)-3-Hydroxybutyrate. Pages 1836–1839 in Methods of Enzymatic Analysis. 2nd English ed. H. U. Bergmeyer, ed., in collaboration with K. Gawehn. Academic Press Inc., New York, NY.

Zwald, N. R., K. A. Weigel, Y. M. Chang, R. D. Welper, and J. S. Clay. 2004. Genetic selection for health traits using producer-recorded data. II. Genetic correlations, disease probabilities, and relationships with existing traits. J. Dairy Sci. 87:4295–4302. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73574-2.

Etude 2 : Etude des interactions entre le déficit énergétique et la réponse inflammatoire mammaire

Article publié dans Scientific Report

Objectif et démarche

L'objectif de cette étude était d'identifier i) les conséquences éventuelles du déficit énergétique sur le transcriptome sanguin, ii) l'interaction éventuelle entre le bilan énergétique négatif et la réponse à une épreuve inflammatoire mammaire étudiée à travers l'analyse du transcriptome sanguin à l'aide de données RNAseq. L'étude portait sur la moitié des brebis du schéma expérimental (6 brebis par groupe). Les brebis ont été choisies de manière à obtenir quatre sous-groupes représentatifs de leur groupe initial sur la production laitière et les concentrations de BHB et d'AGNE. Trois analyses des données RNAseq ont été réalisées à l'aide du package DESeq2 afin de déterminer :

- l'effet de la réponse au déficit énergétique sur trois pas de temps : brebis restreintes (n=12) vs brebis non restreintes (n=12)
- l'effet de la réponse précoce au challenge inflammatoire : H8 post-challenge (n=24) vs H0 (n=24)
- l'effet de l'interaction du bilan énergétique avec le challenge inflammatoire

Des analyses par qPCR ont été menées afin de vérifier les hypothèses formulées.

Résultats

Nous avons identifié 191 gènes différemment exprimés (GDE) en réponse à la restriction énergétique. La voie de biosynthèse du cholestérol était la fonction la plus représentée parmi ces gènes et était inhibée chez les brebis restreintes. En revanche, l'oxydation des AGNE semblait fortement activée en réponse à la restriction énergétique. En effet, le gène CPTIA, enzyme clé de la régulation de la β-oxydation des acides gras, ainsi que deux gènes codant pour des enzymes participant à l'oxydation des acides gras, étaient surexprimés dans les leucocytes sanguins des brebis restreintes. La synthèse des acides gras et des triglycérides était inhibée par la restriction énergétique, ainsi que l'oxydation du glucose, comme le suggère l'importante surexpression de PDK4 qui code pour une enzyme inhibant la pyruvate déshydrogénase et ayant un rôle clé dans la régulation de l'oxydation du glucose. L'analyse biologique suggérait que le facteur de transcription SREBF1 pourrait jouer un rôle dans l'inhibition des voies lipogéniques.

L'analyse de l'interaction entre le régime et la réponse à l'épreuve inflammatoire n'a pas permis d'identifier de gènes différentiels. Cependant, parmi les GDE en réponse au challenge, 64 gènes étaient communs avec les GDE en réponse à la restriction énergétique, dont une majorité de gènes des fonctions métaboliques. Contrairement à l'inhibition qui était observée en réponse à la restriction énergétique, les synthèses du cholestérol et d'acides gras semblaient activées durant la phase précoce de l'inflammation. De plus, les voies de synthèse énergétique variaient de façon opposée entre la réponse à l'épreuve inflammatoire et la réponse à la restriction énergétique. En effet, l'oxydation des acides gras semblait inhibée et celle du glucose activée au cours de la réponse inflammatoire. Neufs gènes intervenant dans ces différents réseaux métaboliques ont été testés par qPCR et ont confirmé les hypothèses suggérées par le RNAseq.

Conclusion

Cette étude n'a pas permis d'identifier une interaction directe entre un bilan énergétique négatif d'intensité comparable à celui qui est observé en début de lactation et la qualité ou l'intensité de la réponse inflammatoire systémique. Cependant une possible compétition au sein des voies métaboliques a été mise en évidence entre la réponse au déficit énergétique et la réponse inflammatoire. En effet, la restriction énergétique a entrainé une utilisation préférentielle des acides gras dans le sang, réduit celle du glucose et les synthèses lipidiques, alors que l'inflammation mammaire a accru l'utilisation du glucose, et a diminué celle des acides gras, en activant la synthèse lipidique.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Whole blood transcriptome analysis reveals potential competition in metabolic pathways between negative energy balance and response to inflammatory challenge

Received: 28 November 2016
Accepted: 11 April 2017
Published online: 24 May 2017

Juliette Bouvier-Muller[1,2], Charlotte Allain[1], Guillaume Tabouret[2], Francis Enjalbert[1], David Portes[3], Céline Noirot[4], Rachel Rupp[1] & Gilles Foucras[2]

Negative Energy Balance (NEB) is considered to increase susceptibility to mastitis. The objective of this study was to improve our understanding of the underlying mechanisms by comparing transcriptomic profiles following NEB and a concomitant mammary inflammation. Accordingly, we performed RNA-seq analysis of blood cells in energy-restricted ewes and control-diet ewes at four different time points before and after intra mammary challenge with phlogogenic ligands. Blood leucocytes responded to NEB by shutting down lipid-generating processes, including cholesterol and fatty acid synthesis, probably under transcriptional control of *SREBF 1*. Furthermore, fatty acid oxidation was activated and glucose oxidation and transport inhibited in response to energy restriction. Among the differentially expressed genes (DEGs) in response to energy restriction, 64 genes were also differential in response to the inflammatory challenge. Opposite response included the activation of cholesterol and fatty acid synthesis during the inflammatory challenge. Moreover, activation of glucose oxidation and transport coupled with the increase of plasma glucose concentration in response to the inflammatory stimuli suggested a preferential utilization of glucose as the energy source during this stress. Leucocyte metabolism therefore undergoes strong metabolic changes during an inflammatory challenge, which could be in competition with those induced by energy restriction.

The transition from late gestation to early lactation is the most metabolically challenging physiological stage in dairy ruminants. Energy balance (EB) is an important parameter in dairy ruminants, defined as the difference between energy intake from feed and energy required for body maintenance, gestation and milk production. During the periparturient period, ruminants experience some degree of negative energy balance (NEB) due to the increased energy demand required to support fetal growth and lactation coupled with a reduced appetite and dry matter intake[1]. Indeed, NEB leads to extensive mobilization of lipids from adipose tissue and results in increased concentrations of circulating non-esterified fatty acids (NEFA) and ketone bodies such as β-hydroxybutyrate (BHB)[2].

Increased susceptibility to mastitis during the peripartum period has been widely documented, as reviewed by Pyörälä[3]. Large-scale studies have also demonstrated an association between blood NEFA and BHB and the risk of mastitis during early lactation[4,5]. In addition, several *in vitro* studies have reported an impairment of immune

[1]INRA, UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage, F-31326, Castanet-Tolosan, France. [2]Université de Toulouse, École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT), INRA, Interactions Hôtes - Agents Pathogènes (IHAP), F-31076, Toulouse, France. [3]INRA, Unité expérimentale 0321 Domaine de La Fage, F-12250, Roquefort sur Soulzon, France. [4]INRA, UR875, Castanet-Tolosan, France. Rachel Rupp and Gilles Foucras share senior authorship. Correspondence and requests for materials should be addressed to G.F. (email: g.foucras@envt.fr)

functions in response to increased concentrations of NEFA or BHB in the culture milieu. For instance, Scalia *et al.*[6] showed that high concentrations of NEFA reduced bovine polymorphonuclear cell (PMN) viability *in vitro*.

Little is known about the effect of NEB on blood gene expression and the response to an intramammary challenge. Moyes *et al.*[7] compared the expression of 20 genes measured by qPCR in blood PMN between NEB and control-diet cows (n = 5) during a *Streptococcus uberis* intramammary challenge. The small number of differentially expressed genes did not allow the identification of differential pathways and an understanding of underlying biological mechanisms between blood immune response and NEB but instead opened the way to further studies on the biological basis for this association.

Transcriptome sequencing (RNA-seq) technologies provide a unique opportunity to analyze changes in gene expression across the entire expressed genome without a priori knowledge[8]. This technology has distinct advantages over microarrays, including the sensitive detection of all expressed genes without the need to generate an array of probes based on a known sequence, virtually no background noise, and a much higher dynamic range. RNA-seq has recently been widely used in domestic animals in order to identify the differentially expressed genes (DEGs) and novel transcript units.

A very limited number of studies related to NEB or mastitis traits have examined these questions using RNA-seq technology. Jin *et al.*[9] showed differences in miRNA expression in bovine mammary epithelial cells challenged with *E. coli* or *S. aureus*. McCabe *et al.*[10] studied the effect of NEB in bovine liver by using RNA-seq. However, to our knowledge, the effect of a NEB or a mammary inflammatory challenge has never been investigated on blood cells using RNA-seq technology. The objective of this study was therefore to describe and to compare the effects of a NEB and those of a concomitant inflammatory challenge on blood cell transcriptomes using RNAseq. For that purpose, we performed RNA-seq analysis of blood cells in energy-restricted ewes and control-diet ewes at four different sampling time points during an inflammatory challenge. The results described herein provide a significant advance in our knowledge of metabolic changes in blood cells during energy restriction and an inflammatory challenge of the mammary gland.

Results

A total of 4,888 million paired-end reads were obtained from the transcriptome sequencing of the 96 blood samples analyzed (Subdata 1). Neither diet nor sampling time had any effect on the number of reads. The dataset obtained with FeaturesCount showed sample counts for 25,197 genes. After descriptive analysis, one outlier sample was removed from the dataset.

Effect of diet and inflammatory challenge on phenotypic indicators. Results of the phenotype analysis are shown in Subdata 2. Ewes in the first month of lactation that were subjected to energy restriction had decreased body weight (BW), body condition score (BCS), milk yield and an increased fat-to-protein (F:P) ratio when compared to PEB ewes. Blood analyses revealed that NEB ewes also had higher BHB and NEFA concentrations and lower glucose concentrations than PEB ewes. However, no difference was observed between groups for insulin or T3 concentrations. Energy restriction had no significant effect on milk SCS, and total or subtype blood leucocyte concentrations.

The inflammatory mammary challenge induced a slight increase in glucose concentration. Statistically, a decrease in BW was also observed upon the inflammatory challenge; however, this difference was mainly observed in NEB ewes. Moreover, BW measurements were taken at an interval of 4 days around the inflammatory challenge, and the decrease in BW around this period is most probably due to energy restriction. The inflammatory challenge had no effect on BCS, F:P ratio or milk yield. No difference was observed either in BHB, NEFA, insulin, or T3 concentrations in the early response to the inflammatory challenge. As expected, the challenge elicited a strong increase in milk SCS and a decrease in total blood leucocytes. The number of all types of blood leucocytes was decreased in response to the inflammatory challenge (Subdata 2). However, neither the diet nor the inflammatory challenge had an effect on the blood cell composition. Blood cell percentages according to the diet and the inflammatory challenge are presented in Subdata 3.

Differential expression of genes between PEB and NEB ewes. We used three time points to obtain a strong list of DEGs in response to energy restriction (H0, H8, H24). The effect of the inflammatory challenge was corrected by the statistical model. A total of 191 genes were found to be differentially expressed in response to energy restriction (NEB vs. PEB at three sampling time points). Of these, 84 genes were up-regulated and 107 genes were down-regulated by NEB. Using Ingenuity Pathway Analysis®, a total of 183 genes were mapped or recognized based on annotation to human or mouse orthologs within the IPA Knowledge Base. PCA performed on the 191 DEGs in response to energy restriction are presented in Fig. 1. The first component on the PCA explained 22% of the variability between the samples and clearly discriminated between the two diets, supporting the hypothesis that the 191 genes were differential between the two diets.

Top canonical and signaling pathways (FDR < 0.05, ratio > 0.1) are reported in Table 1. At the pathway level, the *superpathway of cholesterol biosynthesis* was the most significant pathway modified in response to energy restriction. Eight DEGs associated with this pathway were all down-regulated: *CYP51A1* (FC = 0.8), *DHCR24* (FC = 0.9), *FDFT1* (FC = 0.86), *HMGCS1* (FC = 0.83), *IDI1* (FC = 0.92), *LSS* (FC = 0.83), *MVD* (FC = 0.86) and *SQLE* (FC = 0.82). A subset of those same DEGs supported the down-regulation of the *Cholesterol biosynthesis* and the *Mevalonate Pathway*. On the other hand, *TNFR2 signaling* was also inhibited. Three DEGs were associated with this pathway: *MAPK8* (FC = 0.82), *NFKB2* (FC = 0.92) and *BIRC3* (FC = 0.91).

We next looked for the upstream transcriptional regulators that could explain the observed gene expression changes and elucidate the biological activities due to NEB. The most significant upstream regulators, including peroxisome proliferator-activated receptor alpha (*PPARα*) and sterol regulatory element-binding transcription factor (*SREBF*) 1 and 2, are shown in Subdata 4. *PPARα*, which is a major regulator of lipid metabolism in the

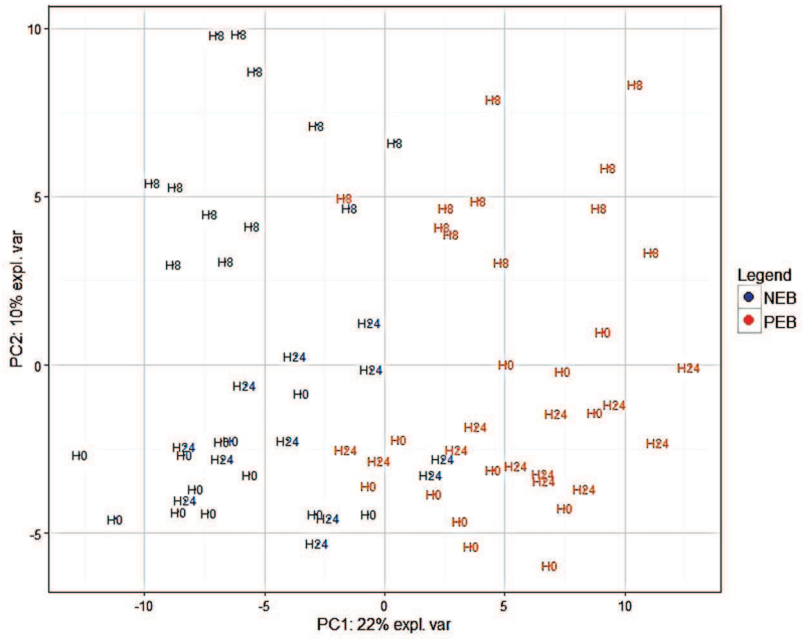


Figure 1. PCA performed on the 191 DEGs in response to energy restriction. The orange and blue colors indicate samples from Positive Energy Balance (PEB) and Negative Energy Balance (NEB), respectively. H0, H8 and H24 indicate the sampling hour relative to the inflammatory challenge.

Ingenuity Canonical Pathways	q-value[1]	Ratio[2]	Up/Down regulated	DEG
Superpathway of Cholesterol Biosynthesis	7.6E-05	0.10	0/8	MVD, SQLE, FDFT1, DHCR24, IDI1, LSS, HMGCS1, CYP51A1
Cholesterol Biosynthesis	9.1E-04	0.13	0/5	SQLE, FDFT1, DHCR24, LSS, CYP51A1
Mevalonate Pathway I	4.6E-02	0.11	0/3	MVD, IDI1, HMGCS1
TNFR2 Signaling	5.0E-02	0.10	0/3	MAPK8, NFKB2, BIRC3

Table 1. Top canonical and signaling pathways among Differentially Expressed Genes (DEGs) in response to energy restriction (NEB vs. PEB) with a q-value < 0.05 and a ratio > 0.1. [1]The q-value shows the significance of the enrichment of a function within the DEGs, adjusted by Benjamini and Hochberg's FDR. [2]Ratio of DEGs/number of genes in the pathway.

liver, was the most significant upstream regulator and was predicted to be activated (p-value of overlap = 3.21E-13, activation z-score = 2.56). In our dataset, *PPARα* expression tended to be down-regulated (FC = 0.8) with an adjusted p-value close to significance (p-value = 0.004, q-value = 0.1). PPARα was predicted in interaction with 23 DEGs, including *CPT1A* and *PDK4*, which were among the most up-regulated DEGs in the dataset.

SREBF 1 and 2 functions were predicted as being down-regulated, according to their association with 11 and 8 DEGs (p-value of overlap = 2.27E-7, activation z-score = −2.16 and p-value of overlap = 3.65E-8, activation z-score = −2.62, respectively). In our dataset, *SREBF 1* and *2* expressions were down-regulated (both FC = 0.92) with a p-value of 0.03 (q-value = 0.3) and 0.006 (q-value = 0.1), respectively. These transcription factors are major regulators of cholesterol synthesis and most of their predicted target molecules were DEGs described above in the inhibition of the *superpathway of cholesterol biosynthesis* (*CYP51A1*, *FDFT1*, *HMGCS1*, *IDI1*, *LSS*, *MVD* and *SQLE*). *FADS1*, which encodes for fatty acid desaturase, was down-regulated in NEB ewes and predicted to be down-regulated by SREBF1.

Differential expression of genes in response to the inflammatory challenge. After 10 days, ewes were challenged by an intramammary injection of a combination of MAMPS (Pam_3CSK_4 and MDP) to induce a mammary inflammation. When comparing the gene expression profiles at 0 and 8 h after the challenge, a total of 3482 genes were differentially expressed and of these, 1641 genes were down-regulated, whereas 1841 genes were up-regulated. A total of 3101 genes were recognized by IPA for functional analysis.

Top canonical and signaling pathways (q-value < 0.01, ratio > 0.1) are reported in Table 2. Pathways playing major roles in the immune response like *B Cell Receptor Signaling, IL-6 Signaling, IL-10 Signaling, TNFR1 Signaling, Toll-like Receptor Signaling, Leukocyte Extravasation Signaling, iNOS Signaling* were highly significantly activated in response to the inflammatory challenge. *DNA Methylation and Transcriptional Repression Signaling*

Ingenuity Canonical Pathways	q-value[1]	Ratio[2]	Up/Down regulated
B Cell Receptor Signaling	2.45E-04	0.27	38/11
DNA Methylation and Transcriptional Repression Signaling	3.72E-04	0.60	11/1
ATM Signaling	2.24E-03	0.36	9/12
3-phosphoinositide Degradation	2.24E-03	0.26	27/13
Role of BRCA1 in DNA Damage Response	5.37E-03	0.31	9/15
D-myo-inositol-5-phosphate Metabolism	5.89E-03	0.25	25/13
IL-6 Signaling	5.89E-03	0.27	25/6
IL-10 Signaling	5.89E-03	0.31	17/5
TNFR1 Signaling	5.89E-03	0.35	10/7
DNA Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination	5.89E-03	0.57	1/7
Cyclins and Cell Cycle Regulation	5.89E-03	0.30	16/7
D-myo-inositol -Tetrakisphosphate Biosynthesis	5.89E-03	0.25	21/13
Toll-like Receptor Signaling	6.31E-03	0.30	14/8
Leukocyte Extravasation Signaling	6.92E-03	0.23	32/14
Superpathway of Inositol Phosphate Compounds	6.92E-03	0.22	32/16
iNOS Signaling	7.24E-03	0.34	13/3
Estrogen Receptor Signaling	7.59E-03	0.25	18/14

Table 2. Top canonical and signaling pathways among Differentially Expressed Genes (DEGs) in early response (H + 8) to the inflammatory challenge with a q-value < 0.01 and a ratio > 0.1. [1]The q-value shows the significance of the enrichment of a function within the DEGs, adjusted by Benjamini and Hochberg's FDR. [2]Ratio of DEGs/number of genes in the pathway.

was also highly activated by the inflammatory challenge. On the other hand, pathways related to reparation of DNA like *ATM Signaling, DNA Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination* and *Role of BRCA1 in DNA Damage Response* were inhibited.

Overlapping features between response to energy restriction and the early response to the inflammatory challenge. There was no significant gene in the Diet X Challenge interaction, suggesting that there was no straightforward modification of the response to inflammation according to diet, given the power of the current design. However, when comparing the two lists of DEGs, we identified 64 genes in common between the response to energy restriction and the early response to the inflammatory challenge. The list of 64 genes was further scrutinized to study overlapping (or conflicting) biological features between the two types of challenges, i.e., low energy diet vs. MAMPs-induced inflammation. The list was analyzed upon uploading in IPA. Figure 2 shows the relationship between changes due to energy restriction and those due to the early response to the inflammatory mammary challenge of the mammary gland. Several DEGs implicated in metabolic processes were present. Among them, *PDK4*, which was one of the DEGs with the highest upregulation in response to energy restriction, was down-regulated in early response to the inflammatory challenge. Fatty acid desaturase (*FADS1*) and Mevalonate Diphosphate Decarboxylase (*MVD*) were down-regulated in NEB ewes and up-regulated in response to the inflammatory challenge.

Within the list of 64 DEGs, *PPARD* and *SREBF1* were predicted to be the most differential transcription regulators in response to energy restriction and early response to inflammatory challenge (Fig. 3). On the one hand, it was predicted that *PPARD* expression would be activated in response to energy restriction (z-score = 2.4) and inhibited in early response to the inflammatory challenge (z-score = −0.8). The predicted inhibition in response to the challenge was not consistent with a change in gene expression; indeed, *PPARD* was part of the list of 64 DEGs common to the responses to energy restriction (q-value = 0.03, FC = 1.09) and inflammatory challenge (q-value = 4.65E-08, FC = 1.17).

On the other hand, it was predicted that *SREBF 1* would be inhibited in response to energy restriction (z-score = −2.2) and activated in early response to the inflammatory challenge (z-score = 1.0). Those predictions were in agreement with observed FC. Indeed, as described previously, *SREBF1* had a tendency to be down-regulated in response to energy restriction in our dataset. *SREBF1* also had a tendency to be up-regulated in response to inflammatory challenge (q-value = 0.07, FC = 1.12). It was predicted that *SREBF1* was related to *FADS1*, *FDFT1*, *HMGCS1* and *MVD*, and these molecules were down-regulated in response to energy restriction and up-regulated in the early response to the inflammatory challenge, except *HMGCS1*, which was slightly up-regulated in response to the inflammatory challenge. *FDFT1*, *HMGCS1* and *MVD* are DEGs that are related to cholesterol biosynthesis described above.

RT- qPCR validation of the differentially-expressed genes in response to energy restriction and the inflammatory challenge. RT- qPCR was used to confirm the response of nine metabolic genes to energy restriction and to the inflammatory challenge on a new set of samples collected during the same experiment (Table 3). Five genes involved in the cholesterol synthesis were tested: *HMGCS1*, *MVD*, *FDFT1*, *CYP51A1* and *SQLE*. Their down-regulation in response to the energy restriction was confirmed by qPCR, whereas

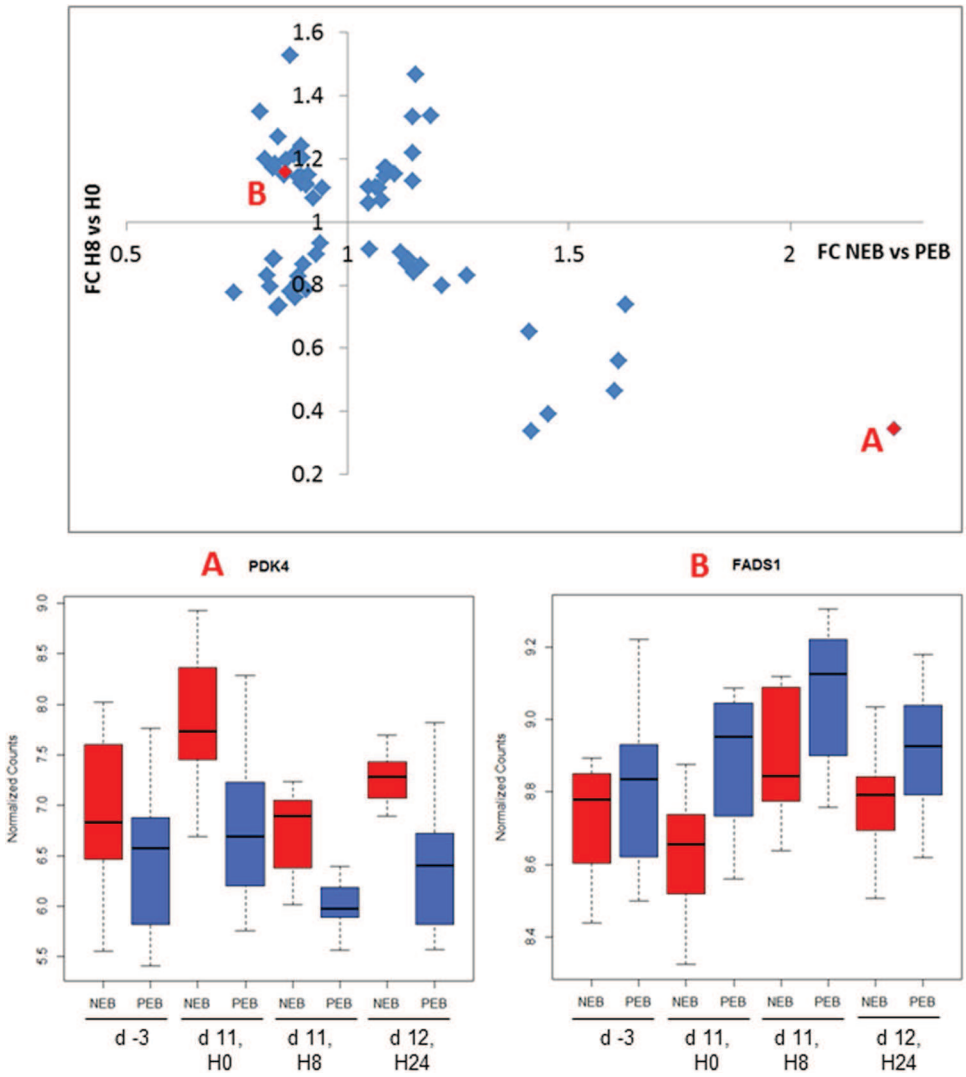


Figure 2. Fold change of the DEGs (q-value < 0.05) in response to energy restriction according to the fold change of the DEG (q-value < 0.05) in early response to inflammatory challenge. Boxplots show normalized counts of *FADS1* and *PDK4* genes in blood cells of Negative Energy Balance (NEB) ewes (red, n = 12) and Positive Energy Balance (PEB) ewes (blue, n = 12) at four different time points. Day time points are related to the first day of energy restriction (d 0) and hour time points are related to the inflammatory challenge (H0).

upregulation was shown in response to the inflammatory challenge except for *CYP51A1*. *CPT1A*, *PDK4*, *FADS1* and *BDH1* were amongst the most differential genes in response to energy restriction and their expression changes were confirmed in response to both challenges, except CPT1A downregulation during the inflammatory challenge.

Discussion

One of the focuses of our study was to test the hypothesis that metabolic and signaling pathways are altered in ruminant blood cells during energy shortage and associated ketosis using periparturient ewes as a model. Biological parameters of NEB ewes showed decreased serum glucose concentration (−6%) and dramatically increased serum NEFA (+43%) and BHB (+97%) concentrations compared to PEB ewes. Results were consistent with previous data on a larger number of animals (n = 48) from the same design (e.g. ref. 11). These results suggest that our feed restriction model was appropriate for mimicking adaptations generally observed in postpartum high-yielding dairy species.

In the present experiment, the most differential pathway in response to energy restriction was the decrease observed in cholesterol synthesis (down-regulation of *CYP51A1*, *DHCR24*, *FDFT1*, *HMGCS1*, *IDI1*, *LSS*, *MVD* and *SQLE*). The reaction catalyzed by HMGCS1 is the rate-determining step on the pathway for synthesis of cholesterol[12], and HMGCS1 gene expression was confirmed downregulated in response to energy restriction by the qPCR validation. This decrease in cholesterol biosynthesis is also supported by a microarray study describing the down-regulation of cholesterol synthesis in the liver of feed-restricted lactating cows compared with cows fed ad libitum[13], suggesting that blood leucocytes and hepatocytes share similar alterations of cholesterol metabolism

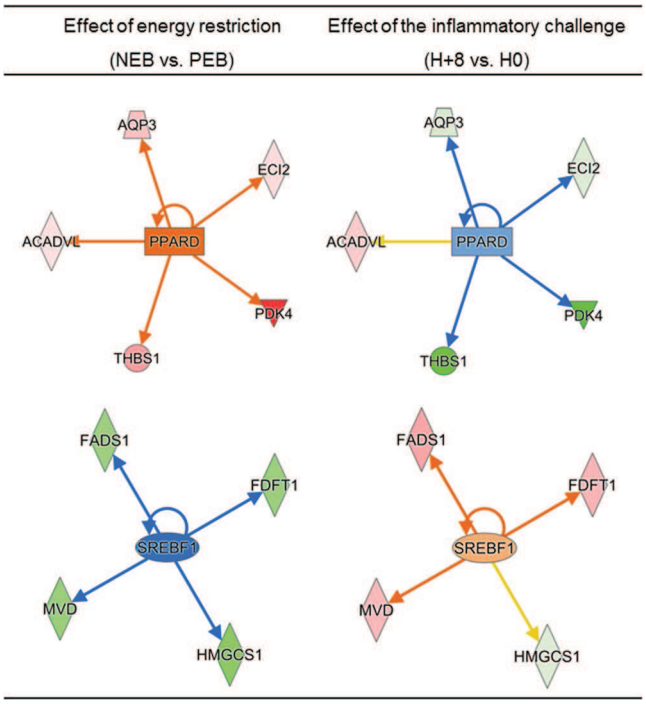


Figure 3. Predicted transcription regulators related to DEGs (q-value < 0.05) for both response to energy restriction and early response to the inflammatory challenge. Molecules highlighted in green were down-regulated and molecules highlighted in red were up-regulated.

Trait	Effect of diet			Effect of inflammatory challenge		
	lsmeans	lsmeans	Relative effect	lsmeans	lsmeans	Relative effect
	PEB	NEB	(NEB vs PEB)	Before	After	(After vs Before)
BDH1	1.07	0.78	−27.0*	0.81	1.09	+34.8•
CPT1A	1.16	2.01	+72.7***			
CYP51A	1.11	0.87	−21.2*			
FADS1	1.41	1.12	−21.0.	0.95	1.54	+63.0**
FDFT1	1.42	1.11	−21.7*	0.98	1.65	+68.5***
HMGCS1	1.27	0.96	−24.8**	0.98	1.20	+22.7•
MVD	1.25	0.97	−22.5*	0.88	1.37	+55.0**
PDK4	1.11	2.46	+121.9***	2.09	1.16	−44.5**
SQLE	1.36	1.01	−25.8**	1.00	1.40	+40.6**

Table 3. Analysis of variance (linear mixed model) of the effect of diet (Positive Energy Balance: PEB vs Negative Energy Balance: NEB) and of the inflammatory challenge (after vs before) on RT-qPCR data measured in a different set of samples. Variation between two conditions (B compared to A) was calculated as a relative difference in lsmeans: (lsmeansB-lsmeansA)/lsmeansA. NEB ewes (n = 12) were compared to PEB ewes (n = 12). Gene expression after the inflammatory challenge (n = 24) was compared to gene expression before the inflammatory challenge (n = 24). Significant effects were highlighted by stars: •P < 0.1, *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001.

due to energy restriction. To our knowledge, there is no previous study showing such a decrease in cholesterol synthesis in blood cells in response to energy restriction. Similarly to hepatocytes[14], blood cells therefore achieve cholesterol hemostasis through the control of the expression of key cytosolic enzymes required for their endogenous biosynthesis.

Moreover, expression of genes involved in synthesis of fatty acids and triglycerides was also affected by energy restriction. Indeed, the synthesis of fatty acids from acetyl-CoA and malonyl-CoA is carried out by fatty acid synthase, FAS. Fatty acid synthase is encoded by the *FASN* gene, which had a tendency to be down-regulated (q-value = 0.1, FC = 0.92) in our dataset and in accordance with Loor *et al.*[13]. As previously described by Faulconnier *et al.*[15] in the adipose tissue of lactating goats, fatty acid desaturation was also affected by energy restriction. Indeed, *FADS1* and *SCD*, two genes encoding fatty acid desaturases, were both affected by energy

restriction. *FADS1* was significantly down-regulated in both sets of samples, and *SCD* had a tendency to be down-regulated (q-value = 1.7E-03, FC = 0.86 and q-value = 0.06, FC = 0.78, respectively).

According to our IPA analysis, decreased activities of lipogenic enzymes in blood cells during the early lactation NEB were most probably under the control of sterol regulatory element-binding protein *SREBF* 1 and 2 transcription factors. Such a role of *SREBF* 1 and 2 transcription factors has already been shown in the liver tissue of energy-restricted cattle[13].

On the other hand, expression of genes involved in NEFA oxidation tends to be activated in response to energy restriction. Indeed, *CPT1A*, which encodes a key regulatory enzyme in fatty acid oxidation, was one of the most up-regulated DEGs in response to energy restriction. This up-regulation was significant in both sets of samples, in contrast to Loor *et al.*[13] who did not find any change in *CPT1A* expression in the liver of ketotic cows. CPT1 is anchored in the outer membrane of mitochondria and catalyzes the formation of long-chain acyl-carnitine, which is then allowed to pass through the inner mitochondrial membrane and is thus committed to β-oxidation in the mitochondria. Moreover, *ACADVL* and *ECI2*, which code for enzymes specific to the beta-oxidation of long-chain fatty acids and unsaturated fatty acids, respectively, were both up-regulated. Our study therefore showed that genes involved in fatty acid β-oxidation were up-regulated in NEB ewes to provide acetyl-CoA subsequently used in the TCA cycle. Consequently, fatty acids were possibly used as the main fuel source in blood cells during fasting, as previously shown in human blood leucocytes[16].

Ketogenesis is a mitochondrial process by which acetyl-CoA, mostly derived from the oxidation of fatty acids, is converted through four reactions into acetoacetate, BHB and acetone, all of which are commonly called ketone bodies. The rate-limiting step of ketone body synthesis is the condensation of acetyl-CoA and acetoacetyl-CoA into HMG-CoA by mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (HMGCS2)[17]. Since ketogenesis is mainly hepatic, *HMGCS2* is one of the most highly induced genes in liver during fasting[17]. In our study, we did not observe any change in *HMGCS2* expression in blood cells. Acetoacetate is then liberated by HMG-CoA lyase (HMGCL) from HMG-CoA. Most acetoacetate is further metabolized by the liver into BHB by β-hydroxybutyrate dehydrogenase (BDH1). Ketone bodies are then used by different tissues as fuels, thus saving glucose. In particular, BHB is converted back into acetoacetate by BDH1 once it is taken up by a target tissue. BDH1 was surprisingly down-regulated during energy restriction in our study and this down-regulation was confirmed by the qPCR data in a new set of samples. No difference in other enzymes taking part in BHB oxidation expression was observed, suggesting that ketone bodies were not the main source of energy in blood cells during energy restriction in our study.

Bouwens *et al.* studied the effects of fasting on human peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles[16]. In accordance with our study, they found that the gene encoding pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4 (PDK4) showed the biggest change during fasting. PDK4 inactivates pyruvate dehydrogenase (PDH), inhibiting utilization of pyruvate for acetyl-CoA synthesis, hence blocking glucose oxidation and favoring fatty acid oxidation to generate energy[18]. This gene is known to be regulated by PPARα. Activation of PPARα especially occurs when NEFA concentrations are increased in situations such as fasting and is essential for metabolic adaptation by up-regulating genes for beta-oxidation and ketogenesis, and by down-regulating energy expenditure. Bouwens *et al.* showed that the expression of all PPARα target DEGs was up-regulated during starvation, similar to results of our study[15]. However, no difference in *PPARα* expression could be observed due to fasting in their study. Similarly, *PPARα* expression was predicted to be activated by IPA in our study although it had a tendency to be down-regulated (q-value = 0.1, FC = 0.8).

Glucose uptake is controlled in part by the cell-surface expression of a family of glucose transporters (GLUT). The ubiquitous GLUT1 is the predominant glucose transporter in the bovine mammary gland and is encoded by the gene *SLC2A10*. This gene had a tendency to be down-regulated in our study (q-value = 0.07, FC = 0.8), in accordance with Tsiplajou *et al.*[19] who showed a significant reduction on mRNA of GLUT1 in ovine mammary tissue in response to feed restriction. This observation once again supports a decrease of glucose utilization in blood leucocytes during energy restriction.

To conclude, this analysis suggested that blood leucocytes respond to NEB and ketosis by shutting down lipid-generating processes, including mevalonate, cholesterol and fatty acids synthesis, to a similar extent to what has been previously described for liver tissue. SREBF 1 and 2 seem to play a key role in the regulation of these metabolic processes. Furthermore, activation of several enzymes like PDK4 and CPT1 seemed necessary to block glucose oxidation and induce fatty acid or ketone body oxidation to generate energy, similarly to observations in human blood leucocytes.

No significant interaction between energy balance and the response to the inflammatory challenge on blood transcriptome was identified in our study. This could be explained by the lack of power in our study (2 diets * 2 time points * 12 ewes). However, 64 DEGs in response to energy restriction were also significantly differential in early response to the inflammatory challenge.

From this common list, several metabolic pathways were analyzed as being differential between the response to energy restriction and the response to the inflammatory challenge as shown in Fig. 4. In particular, *FDFT1* and *MVD* were confirmed up-regulated in response to the inflammatory challenge suggesting that cholesterol synthesis was activated. Moreover, genes involved in synthesis of fatty acids and triglycerides were also affected by the inflammatory challenge. Indeed, fatty acid synthase encoded by the *FASN* gene had a tendency to be up-regulated (q-value = 0.1, FC = 1.07). *SCD* and *FADS1*, which encode fatty acid desaturases, were both up-regulated in response to inflammatory challenge, despite small variations. The up-regulation of these lipid-biosynthetic pathways was in accordance with early isotopomer-enrichment studies that demonstrated that the activation of lymphocytes results in a rapid increase in the renewed biosynthesis of cholesterol and fatty acids[20]. According to this study, the synthesis of cholesterol could be an essential prerequisite for successful initiation and completion of the cell cycle in lymphocytes.

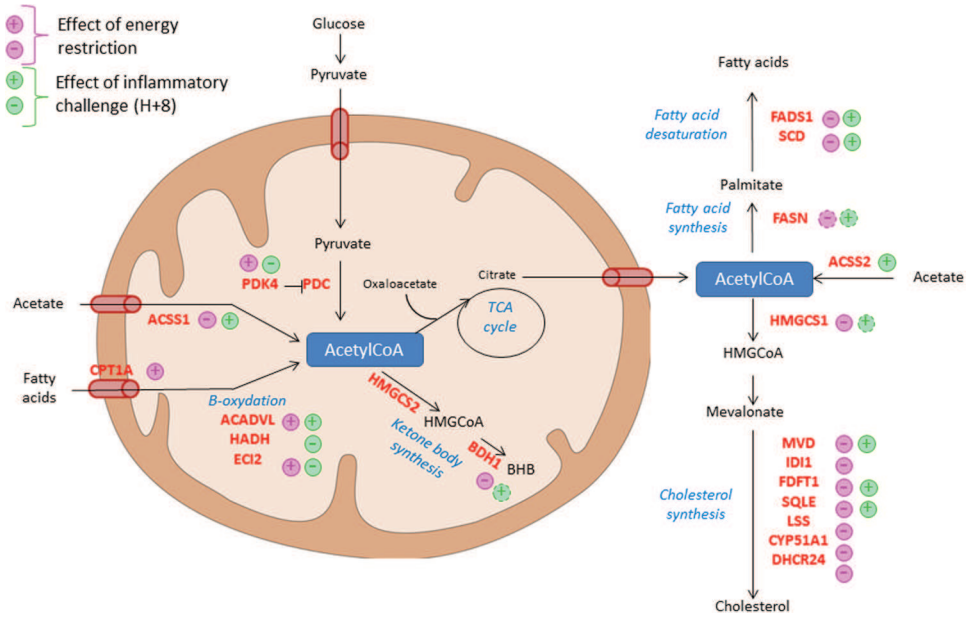


Figure 4. Summary diagram showing the effect of energy restriction and an inflammatory challenge on mitochondrial metabolic processes and their conflicting features. Pyruvate dehydrogenase kinase PDK4 inhibits the pyruvate dehydrogenase complex (PDC). Plus indicates up-regulated DEG and minus down-regulated DEG. Dotted plus or minus indicate DEG that had a tendency (q-value < 0.1) to be respectively up or down-regulated.

Furthermore, IPA predicted that *SREBF1* was a transcription factor differentially expressed in response to the two stresses, inhibited in response to energy restriction as described below and activated in response to the inflammatory challenge. These predictions were supported by trends in differential expression in our dataset (significant for diet and close to significance for challenge) and suggested that *SREBF1* could be the transcription factor responsible for activation of lipid-biosynthetic pathways in response to the inflammatory challenge. In accordance, Kidani *et al.*[21] demonstrated that SREBPs were essential for CD8+ T cells to perform blastogenesis which resulted in attenuated clonal expansion during viral infection. These experiments all together suggest that metabolic reprogramming can be a key component during an inflammatory response due to its link with mitogenic signaling.

PPARγ was also one of the most differentially expressed transcription factors predicted by IPA in response to the two stresses. Moyes *et al.*[22] did not detect any change in PPARγ expression in bovine mammary tissue challenged with *Streptococcus uberis* but suggested that its activity was probably decreased, as supported by the down-regulation of its known target genes. We did observe a down-regulation of PPARγ-known target genes. However *PPARγ* expression was up-regulated in response to the inflammatory challenge, which does not exclude a difference of activation of the protein explaining the PPARγ role in metabolic reprogramming during the inflammatory challenge.

Energy sources appeared also different in response to the inflammatory challenge from those observed in response to energy restriction. First, inflammatory challenge induces changes in genes expression involved in acetate catabolism. In ruminant animals, large amounts of acetate are synthetized by microorganisms in the rumen and need to be catabolized. Generally, mammalian acetyl-CoA synthesis from acetate is carried out by Acyl-CoA Synthetase Short-Chain Family Member (ACSS) 2 to support lipid synthesis in the cytosol and by ACSS1 to fuel ATP production in mitochondria[23]. *ACSS1* and *ACSS2* expression were both activated in response to the inflammatory challenge, whereas *ACCS1* expression was inhibited in response to energy restriction. Our hypothesis is that acetate production could have been decreased in response to the decrease in rumen activity during energy restriction. Similarly to glucose, a decrease in acetate concentration could be associated with its lesser use in blood cells. On the other hand, *ACSS1*, and especially *ACSS2* expression, could have been activated in response to the inflammatory challenge to support the need for acetyl-CoA and, consequently, lipid synthesis during inflammation.

Inflammatory challenge also induced expression changes in genes involved in fatty acid oxidation. Indeed, *ECI2, CPT1A* and *HADH*, which encode an enzyme belonging to the beta-oxidation pathway expressions were or had a tendency to be inhibited in response to the inflammatory challenge.

Finally, genes involved in glucose transport were also affected by the inflammatory challenge. Indeed, *SLC2A3* and *SLC2A10* encoding respectively GLUT3 and GLUT10 were both up-regulated in response to the inflammatory challenge (FC = 1.4 and FC = 1.8, respectively). However, no significant change was observed in GLUT1 transcription. These observations are in accordance with O'Boyle *et al.*[24] who showed that endotoxin stimulation increased gene expression of GLUT3 and GLUT4 in bovine monocytes. On the other hand, *PDK4* expression was inhibited in response to inflammatory challenge as shown in both sets of data, in contrast with Hana Park

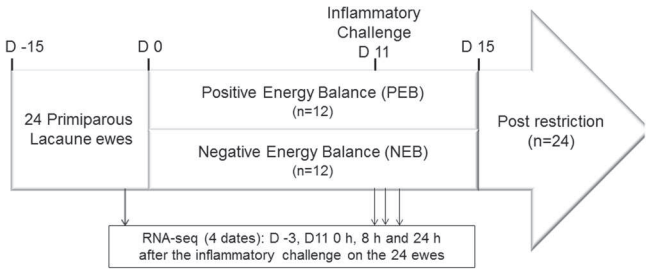


Figure 5. Experiment timeline.

and Nam Ho Jeoung *et al.*[25] who showed that inflammation increases *PDK4* expression via the Jun N-Terminal Kinase (JNK). Jun is a transcription factor whose expression was down-regulated in response to the inflammatory challenge in our dataset. As described below, pyruvate dehydrogenase kinases play a critical role in the inhibition of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex, especially when blood glucose levels are low and pyruvate can be spared for gluconeogenesis. Moreover, glucose concentration increased in response to the inflammatory challenge as shown in the phenotypic analysis. Other researchers have observed elevated plasma glucose concentrations after *E. coli* LPS or *Streptococcus uberis* infusion[26,27]. Those researchers attributed the increased circulating glucose concentrations to enhanced glycogenolysis. Since glucose is the primary fuel used by bovine leukocytes[28], glycogenolysis could be essential to allow immune activity. There is no doubt that further studies are needed to disentangle this hypothesis and to better understand the regulation of the pyruvate dehydrogenase complex in leucocytes during an inflammatory challenge.

Conclusion

Our study indicated that the inflammatory challenge of the mammary gland induced a strong transcriptomic response in blood cells and mainly activated immune pathways. No interaction between energy balance and the response to the inflammatory challenge has been identified. However, energy restriction and inflammatory challenge induced some opposite effects in expression of genes involved in metabolic pathways. Indeed, this analysis suggests that blood leucocytes respond to negative energy balance and ketosis by shutting down lipid-generating processes, including mevalonate, cholesterol and fatty acid synthesis. On the other hand, lipid synthesis seemed increased in response to the inflammatory challenge. In both cases, the transcription factor SREBF 1 appeared to play a key role in the regulation of these metabolic processes, as predicted by IPA and suggested by our dataset. Pathway analysis also suggested an activation of fatty acid oxidation in response to energy restriction and its possible inhibition in response to the inflammatory challenge. Leucocyte metabolism therefore underwent strong changes during an inflammatory challenge, which could be in competition with those induced by energy restriction. Overall, this study suggested a difference in glucose utilization in response to the two stresses. Indeed, the strong increase in PDK4 transcription in response to energy restriction suggested an inhibition of glucose oxidation, whereas its decrease in response to inflammatory challenge, coupled with the increase of plasma glucose concentration and glucose transporter expression, suggested that glucose utilization and oxidation were enhanced by the inflammatory stress. Two hypotheses can be formulated in light of these results. Either glucose oxidation increased because glucose concentration was no longer low, or glucose concentration increased to meet the increasing need of glucose in leucocytes during the inflammatory challenge. Further studies are needed to disentangle these hypotheses and to better understand leucocyte metabolism during an inflammatory stress.

Methods

All procedures involving animals received approval from the Ethics Committee on Animal Experimentation of Toulouse (France), with all applicable provisions established by the European directive 2010/63/UE. All methods were performed by approved staff members in accordance with the relevant standard operating procedures approved by the above mentioned ethics committee. All animals used in this study were handled in strict accordance with good clinical practices and all efforts were made to minimize suffering.

Experimental design. A detailed description of the experimental design can be found in Bouvier-Muller *et al.*[11]. Briefly, 24 primiparous Lacaune ewes from the two genetic lines, High and Low-SCS, divergently selected for high and low mastitis resistance as described in Rupp *et al.*[29] were used. Two weeks after lambing, the ewes were randomly assigned to either the Negative Energy Balance (NEB) or Positive Energy Balance (PEB) groups to obtain two groups of 12 ewes. The ewes assigned to the PEB treatment were fed a control diet composed of a standard total mixed ration for ad libitum intake. Ewes assigned to the NEB regimen were restricted to 60% of the calculated net energy requirements based on individual body weight and milk production. As shown in Fig. 5, the first day of restriction was referred to as d 0 in the experiment timeline. Ewes were maintained under their specific regimen for 15 days. After 11 days of feed restriction and following the morning milking, all ewes were injected with a solution of phlogogenic agents (Pam3CSK4 and MDP) into the healthiest half-udder. A detailed description of the phenotype collection can be found in Bouvier-Muller *et al.*[11].

Flow cytometry enumeration of leukocyte subsets in whole blood. Blood was collected in EDTA-coated tubes. Sixty microliters of whole blood were incubated with cocktails of pre-conjugated monoclonal antibodies for 20 minutes at room temperature in the dark. Red blood cell lysis was achieved by adding 500 µL of

MACS RBC Lysis Solution (Miltenyi Biotec) for 10 minutes. Osmolarity of the solution was restored using FACS buffer (Dulbecco's modified PBS, calcium and magnesium free, 2.5 mM EDTA, 0.1% BSA, pH 7.2) to a final volume of 1.2 mL, thus giving a 1:20 dilution of the original blood volume. Blood leucocytes were first gated based on CD45 expression (clone 1.11.32, Biorad, USA), and granulocytes and mononuclear cells were identified based on forward and side scatter distribution. A combination of CD2 (clone CC42, Biorad, USA) and CD14 (clone TÜK4, Biorad, USA) allowed identification of monocytes as $CD2^{neg}$ $CD14^{pos}$, T cells as $CD2^{pos}$, $CD14^{neg}$, and non T lymphocytes as $CD2^{neg}$ $CD14^{neg}$ cells (Subdata 6). Samples were acquired using a MACSQuant Analyzer capable of absolute cell count (Miltenyi Biotec). Total cell numbers per milliter in the original sample were calculated by multiplying the number of cells per mL in the $CD45^{pos}$ gate by the dilution factor (1:20).

Statistical analysis of phenotype and leukocyte enumeration. Analyses of variance using linear mixed models with the R (3.1.2) Bioconductor package nlme (3.1) were applied to determine the effects of the diet and the inflammatory challenge on the different phenotype and leukocyte enumeration. To test the effect of the energy restriction, the model included the fixed effects of Diet (DIET; PEB and NEB), genetic line (LINE; SCS+ and SCS−), and the random animal effect. To test the effect of the inflammatory challenge, we compared data before and after the challenge. The model included Diet (DIET; PEB and NEB), Genetic line (LINE; SCS+ and SCS−), Challenge (Challenge; Before or After) and the random animal effect. Statistical differences were declared as significant and highly significant at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively. Trends toward significance are discussed at $P < 0.10$. For an effect with a $P < 0.10$, lsmeans were extracted with the lsmeans package (2.20). Variation between two conditions (B compared to A) was then calculated as a relative difference in lsmeans: (lsmeansA-lsmeansB)/lsmeansA.

RNA extraction. Blood samples were collected by jugular venipuncture on d -3, on d 11 at 0 and 8 hours post-challenge, and on d 12 at 24 hours post-challenge, as shown in Fig. 5. Samples were drawn from each ewe into blood collection tubes (6-ml BD Vacutainer®) containing EDTA for plasma and were immediately placed on ice. Total RNA was isolated from blood samples using the commercially available NucleoSpin® RNA Blood kit, according to the manufacturer's protocol. Obtained RNA was quantified by measuring the absorbance at 260 nm using a NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and integrity was checked by Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The RNA integrity value (RIN) of the samples ranged between 7.1 and 9.

Library preparation for Illumina sequencing. cDNA libraries were prepared from high quality RNA using an Illumina TruSeq RNA sample prep kit, following the manufacturer's instruction (Illumina, San Diego, CA, USA). Samples were tagged to allow subsequent identification, amplified by polymerase chain reaction (PCR) and quantified by quantitative PCR (Agilent QPCR Library Quantification Kit). Individual RNA-seq libraries were sequenced in triplicate at 100 bp/sequence paired-end reads using an Illumina HiSeq 2500 sequencer (Illumina, TruSeq PE Cluster Kit v3, cBot and TruSeq BS Kit v3) at the GenoToul genomic platform (Castanet-Tolosan, France). Library positions were randomized in four different sequencing lanes to avoid confusing flow cell/lane effects.

Quality Control, Mapping and Quantification. FastQC (v0.10.0) was used to assess the quality of raw sequencing data. Input reads were then aligned to the ovine reference genome (ENSEMBL v74) using STAR (v2.4.0). For the mapping, the number of multiple alignments allowed for a read was 10 (if exceeded, the read was considered unmapped). Intron length was allowed between 10 and 25000 nucleotides. The alignments were sorted with Samtools (v0.1.19). To compare the expression levels of genes across samples, raw counts for the genes were obtained using the FeaturesCount software package and the ENSEMBL v74 annotation of the ovine genome. For counting, the RNA sequencing was indicated as reversely stranded and paired end (fragments were counted instead of reads, and paired distances were checked). Only primary alignments were counted, and chimeric fragments were not included for summarization.

Differential Expression Analysis. The R (3.3.1) package, DESeq2 (1.12.4), was applied to identify statistically significant differentially-expressed genes (DEGs). DESeq normalizes the count data from high-throughput RNA sequencing across samples, based on the hypothesis that most genes are not DE. DESeq uses a negative binomial distribution to model biological and technical variance for the count data. It allows testing for differential expression between two experimental conditions.

To determine DEGs according to DIET, blood RNAseq data collected at the three time points at day 11 and 12 were used. Indeed the separate time by time analyses provide only a few DEG, therefore all relevant time points were included in a multifactor analysis to increase the power of the analysis. The model included diet (DIET; PEB and NEB), genetic line (LINE; SCS+ and SCS−) and time point relative to challenge (DATE; H0, H8 and H24). To determine DEGs according to the inflammatory challenge, RNAseq data collected at the time point before (H0) and the time point after challenge (H8) were used. The model included diet (DIET; PEB and NEB), genetic line (LINE; SCS+ and SCS−) and time point (DATE; H0 and H8). Finally, data from the time points H0 and H8 were used to determine the DEGs according to the interaction, diet: inflammatory challenge. The model included diet (DIET; PEB and NEB), genetic line (LINE; SCS+ and SCS−), time point (DATE; H0 and H8) and interaction (DATE:DIET). The p-values were adjusted using the Benjamini and Hochberg method[30]. A corrected q-value of 0.05 was set as the threshold for DEGs in all analyses.

Biological interpretations of the differentially expressed genes. Ingenuity® Systems Pathway Analysis (IPA, Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA; http://www.ingenuity.com) was used to identify canonical pathways and functional processes of biological importance within the list of DEGs. Each

interaction in the Ingenuity® Knowledge Base is supported by previously published information. The DEGs (with a q-value ≤ 0.05) with their associated annotation (when present) and the log2 Fold Change were uploaded into IPA. The significance of the canonical pathway was measured with the p-value and the ratio of DEG/number of genes in the pathway. A corrected q-value of 0.05 and a ratio of 0.1 were set as the threshold for differential expressed canonical pathways to minimize false positives. IPA additionally provides a z-score that infers the activation state of the canonical pathway. IPA also allows predicting whether some transcriptional factors that are known to regulate the listed focus genes are overrepresented in the data; an overlap p-value that measures whether there is a statistically significant overlap between the dataset genes and the known target genes was also used to describe the significance of the predicted transcriptional factor.

BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) was used to identify a few DEGs that only had an Ensembl annotation. Cover and identification of 60% and 80%, respectively, were set as the thresholds for the validation of the blast.

Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Nine genes involved in metabolic process were assessed by RT-qPCR on blood samples from 24 ewes which followed the same experimental design than the 24 ewes in the discovery step using the RNA-seq technique. After RNA extraction, cDNA was generated using the Superscript III First Strand Synthesis System Kit (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Primer pairs were designed using Primer3plus[31] (Subdata 5) and their specificity was checked with BLAST. Primers were synthesized commercially by Eurogentec. qPCR reactions were performed using Biomark (Fuidigm) at the GenoToul genomic platform (Castanet-Tolosan, France). All assays were carried out in duplicate and Ct values were averaged for technical replicates. The stability of 5 housekeeping genes was evaluated in the 96 samples using GeNorm software. The three most stable genes (*YWHAZ*, *SDH* and *GAPDH*) were retained for normalization. Fold changes were calculated by the delta- delta Ct method[32]. Statistical analysis was performed as detailed in the statistical analysis of phenotype section.

References

1. Drackley, J. K. Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? *J. Dairy Sci.* **82**, 2259–2273, doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75474-3 (1999).
2. Dann, H. M. *et al.* Diets during far-off and close-up dry periods affect periparturient metabolism and lactation in multiparous cows. *J. Dairy Sci.* **89**, 3563–3577, doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72396-7 (2006).
3. Pyörälä, S. Mastitis in Post-Partum Dairy Cows. *Reprod. Domest. Anim.* **43**, 252–259, doi:10.1111/rda.2008.43.issue-s2 (2008).
4. Jánosi, S. *et al.* Energy imbalance related predisposition to mastitis in group-fed high-producing postpartum dairy cows. *Acta Vet. Hung.* **51**, 409–424, doi:10.1556/AVet.51.2003.3.14 (2003).
5. Nyman, A.-K. *et al.* Metabolites and immune variables associated with somatic cell counts of primiparous dairy cows. *J. Dairy Sci.* **91**, 2996–3009, doi:10.3168/jds.2007-0969 (2008).
6. Scalia, D. *et al. In vitro* effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability. *J. Dairy Sci.* **89**, 147–154, doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72078-1 (2006).
7. Moyes, K. M., Drackley, J. K., Morin, D. E. & Loor, J. J. Greater expression of TLR2, TLR4, and IL6 due to negative energy balance is associated with lower expression of HLA-DRA and HLA-A in bovine blood neutrophils after intramammary mastitis challenge with Streptococcus uberis. *Funct. Integr. Genomics* **10**, 53–61, doi:10.1007/s10142-009-0154-7 (2010).
8. Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 57–63, doi:10.1038/nrg2484 (2009).
9. Jin, W. *et al.* Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with Escherichia coli or Staphylococcus aureusbacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. *BMC Genomics* **15**, 181, doi:10.1186/1471-2164-15-181 (2014).
10. McCabe, M. *et al.* RNA-seq analysis of differential gene expression in liver from lactating dairy cows divergent in negative energy balance. *BMC Genomics* **13**, 193, doi:10.1186/1471-2164-13-193 (2012).
11. Bouvier-Muller, J. *et al.* Response to dietary-induced energy restriction in dairy sheep divergently selected for resistance or susceptibility to mastitis. *J. Dairy Sci.* **99**, 480–492, doi:10.3168/jds.2015-9785 (2016).
12. Wang, W. & Tong, T. J. The key enzyme of cholesterol synthesis pathway: HMG-CoA reductase and disease. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* **30**, 5–9 (1999).
13. Loor, J. J. *et al.* Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiol. Genomics* **32**, 105–116, doi:10.1152/physiolgenomics.00188.2007 (2007).
14. Akbar, H. *et al.* Feed restriction, but not l-carnitine infusion, alters the liver transcriptome by inhibiting sterol synthesis and mitochondrial oxidative phosphorylation and increasing gluconeogenesis in mid-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* **96**, 2201–2213, doi:10.3168/jds.2012-6036 (2013).
15. Faulconnier, Y., Chilliard, Y., Torbati, M. B. M. & Leroux, C. The transcriptomic profiles of adipose tissues are modified by feed deprivation in lactating goats. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* **6**, 139–149, doi:10.1016/j.cbd.2010.12.002 (2011).
16. Bouwens, M., Afman, L. A. & Müller, M. Fasting induces changes in peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles related to increases in fatty acid β-oxidation: functional role of peroxisome proliferator–activated receptor α in human peripheral blood mononuclear cells. *Am. J. Clin. Nutr.* **86**, 1515–1523 (2007).
17. Hegardt, F. G. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. *Biochem. J.* **338**(Pt 3), 569–582, doi:10.1042/bj3380569 (1999).
18. Harris, R. A., Bowker-Kinley, M. M., Huang, B. & Wu, P. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex. *Adv. Enzyme Regul.* **42**, 249–259, doi:10.1016/S0065-2571(01)00061-9 (2002).
19. Tsiplakou, E., Flemetakis, E., Kouri, E.-D., Sotirakoglou, K. & Zervas, G. The effect of long term under- and over-feeding on the expression of genes related to glucose metabolism in mammary tissue of sheep. *J. Dairy Res.* **82**, 228–235, doi:10.1017/S0022029915000072 (2015).
20. Chen, H. W., Heiniger, H. J. & Kandutsch, A. A. Relationship between sterol synthesis and DNA synthesis in phytohemagglutinin-stimulated mouse lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1950–1954, doi:10.1073/pnas.72.5.1950 (1975).
21. Kidani, Y. *et al.* Sterol regulatory element-binding proteins are essential for the metabolic programming of effector T cells and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* **14**, 489–499, doi:10.1038/ni.2570 (2013).
22. Moyes, K. M. *et al.* Mammary gene expression profiles during an intramammary challenge reveal potential mechanisms linking negative energy balance with impaired immune response. *Physiol. Genomics* **41**, 161–170, doi:10.1152/physiolgenomics.00197.2009 (2010).

23. Gao, X. *et al.* Acetate functions as an epigenetic metabolite to promote lipid synthesis under hypoxia. *Nat. Commun.* **7**, 11960, doi:10.1038/ncomms11960 (2016).
24. O'Boyle, N. J., Contreras, G. A., Mattmiller, S. A. & Sordillo, L. M. Changes in glucose transporter expression in monocytes of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* **95**, 5709–5719, doi:10.3168/jds.2012-5327 (2012).
25. Park, H. & Jeoung, N. H. Inflammation increases pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) expression via the Jun N-Terminal Kinase (JNK) pathway in C2C12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **469**, 1049–1054, doi:10.1016/j.bbrc.2015.12.113 (2016).
26. Moyes, K. M. *et al.* Dietary-induced negative energy balance has minimal effects on innate immunity during a Streptococcus uberis mastitis challenge in dairy cows during midlactation. *J. Dairy Sci.* **92**, 4301–4316, doi:10.3168/jds.2009-2170 (2009).
27. Waldron, M. R., Kulick, A. E., Bell, A. W. & Overton, T. R. Acute experimental mastitis is not causal toward the development of energy-related metabolic disorders in early postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* **89**, 596–610, doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72123-3 (2006).
28. Weisdorf, D. J., Craddock, P. R. & Jacob, H. S. Granulocytes utilize different energy sources for movement and phagocytosis. *Inflammation* **6**, 245–256, doi:10.1007/BF00916406 (1982).
29. Rupp, R. *et al.* 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 (2009).
30. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 289–300 (1995).
31. Rozen, S. & Skaletsky, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **132**, 365–386 (2000).
32. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, RESEARCH0034 (2002).

Acknowledgements

This work was supported by grants from the RUMINFLAME project, as part of the INRA MetaProgram, Gestion Intégrée de la Santé Animale. This work has received support from an "Investissements d'avenir" grant managed by Agence Nationale de la Recherche under the reference ANR-11-EQPX-0003.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: R.R. and G.F. Performed the experiments: J.B.M., C.A., G.T., D.P. and C.N. Analyzed the data: J.B.M., R.R. and G.F. Wrote the paper: J.B.M., R.R., F.E. and G.F.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-02391-y

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2017

Résultats complémentaires

L'analyse statistique de l'effet du régime aux différentes dates n'a donné qu'un faible nombre de gènes différemment exprimés (Tableau 10), ne permettant pas une analyse biologique pertinente.

Tableau 10 : Effet intradate de la restriction énergétique sur le transcriptome sanguin des échantillons prélevés à J -4 avant le changement alimentaire, à J 11 après le début de la restriction énergétique (J0) à H0, H+8 et H+24 par rapport au challenge immunitaire

Nombre de GDE[1]	J-4	J11 H0	J11 H8	J12 H24
p-value BH[2] < 0.05	0	0	1	0
p-value<0.001	4	38	18	8

[1] GDE : Gènes différentiellement exprimés
[2] p-value BH : P-value corrigée par la méthode de Benjamini-Hochberg

Nous avons donc réalisé une analyse en prenant en compte les trois dates de prélèvement (J11 H0, J11 H8 et J12 H24) auxquelles la moitié des brebis était en restriction énergétique. Cependant, les outils d'analyse statistique des données de RNAseq disponibles à l'heure actuelle, ne permettaient pas de prendre en compte les données répétées en intégrant un effet individu dans le modèle. Afin de valider les GDE obtenus sur l'ensemble des 3 dates, nous avons estimé l'effet régime intra date pour ces gènes (Tableau 11). La totalité des gènes d'intérêt présentait une valeur $p < 0.05$ à J11 H0 donc pendant la restriction énergétique et avant l'épreuve inflammatoire.

Tableau 11 : Effet intradate de la restriction énergétique sur les gènes d'intérêt identifiés comme différentiels en réponse à la restriction énergétique par l'analyse réalisée sur les trois dates de prélèvement.

Voie métabolique	Gène	p-value J-4	p-value J11 H0	p-value J11 H8	p-value J11 H24
Oxydation du glucose	PDK4	7.88E-02	9.54E-04	2.18E-05	3.75E-03
Métabolisme du cholestérol	HMGCS1	1.50E-01	4.29E-05	1.45E-02	5.40E-02
	MVD	4.85E-02	1.79E-03	2.46E-02	1.23E-01
	IDI1	8.17E-01	1.61E-03	2.96E-03	6.78E-01
	FDFT1	2.69E-01	4.81E-03	8.41E-03	4.83E-02
	SQLE	5.33E-02	5.21E-04	3.50E-03	1.69E-02
	LSS	4.21E-01	3.93E-02	7.33E-02	1.54E-02
	CYP51A1	4.20E-01	5.51E-04	1.12E-02	1.76E-02
	DHCR24	3.75E-02	2.54E-03	7.32E-02	1.43E-01
β-oxydation des acides gras	CPT1A	6.00E-02	5.96E-04	1.04E-05	1.26E-03
	ACADVL	4.30E-01	5.85E-03	2.82E-01	1.28E-02
	HADH	5.35E-01	3.92E-02	9.19E-01	6.30E-01
	ECI2	7.60E-02	4.56E-02	3.65E-02	5.31E-02
Production de BHB	BDH1	9.92E-02	8.28E-03	6.64E-04	3.62E-02
Synthèse d'acides gras	FASN	1.18E-01	9.02E-03	6.08E-01	7.62E-02
Désaturation des acides gras	SCD	2.20E-01	3.45E-04	7.66E-03	5.78E-01
	FADS1	2.92E-01	1.43E-04	2.53E-02	5.81E-02
Métabolisme de l'acétate	ACSS1	1.17E-01	4.63E-02	9.90E-02	3.07E-03

Etude 3 : Intégration des données transcriptomiques et phénotypiques et vérification des hypothèses formulées à l'échelle d'un troupeau

Article en préparation, soumission envisagée dans Journal of Dairy Science

Objectif et démarche

L'objectif de cette étude était d'intégrer les données phénotypiques et transcriptomiques dont nous disposions afin i) d'identifier les variables permettant de discriminer au mieux les quatre groupes d'intérêt (CCS+ restreintes, CCS+ non restreintes, CCS- restreintes, CCS- non restreintes), ii) de déterminer les variables les mieux corrélées entre elle, en particulier celles caractérisant le déficit énergétique, et iii) d'utiliser des données d'élevage afin de valider les hypothèses formulées. Le package mixOmics a été utilisé pour l'intégration de données. Une première analyse discriminante a été réalisée sur les 48 brebis du protocole expérimental entre trois blocks de données phénotypiques : les caractères de production (caractères laitiers, poids, NEC), les métabolites (Glucose, Insuline, AGNE, BHB) et la composition d'AG du lait. A la suite de cette analyse, les phénotypes les plus discriminants ont été retenus pour créer un méta-block de phénotypes. Une seconde analyse a ensuite été réalisée entre ce méta-block et les données transcriptomiques sur les 24 brebis dont le transcriptome sanguin avait été analysé par RNAseq. Des données de brebis des lignées CCS+/CCS- qui ont été élevées au domaine expérimental de La Fage, ont été analysées afin de confirmer les hypothèses émises à la suite de ces analyses.

Résultats

Nous avons identifié de fortes corrélations entre les concentrations des AGNE et du BHB avec le rapport TB/TP, la quantité de matières grasses du lait, la quantité d'acides gras à longues chaines dans le lait, et l'expression géniques d'enzymes métaboliques telles que PDK4 ou CPT1A. De plus, ces différentes variables étaient celles qui permettaient de discriminer le groupe de brebis CCS+ restreint, confirmant les résultats obtenus dans la première étude. En accord avec la bibliographie, le rapport TB/TP a été décrit comme un phénotype particulièrement indicatif du déficit énergétique.

Une analyse du TB/TP des brebis des lignées CCS+/CCS- (1025 brebis de 2005 à 2016, 16412 contrôles laitiers) a permis de montrer, dans un deuxième temps, que le rapport TB/TP était significativement plus élevé chez les brebis CCS+ que chez les brebis CCS-, qu'elles soient primipares ou multipares.

Conclusion

Cette étude a donc permis de confirmer les hypothèses émises lors de nos premiers travaux : les brebis de la lignée CCS+ ont mobilisé davantage leurs réserves corporelles que les brebis de la lignée CSS- en réponse à la restriction nutritionnelle avec des conséquences visibles à la fois sur les métabolites sanguins, la composition du lait et l'expression génique des leucocytes. Ces observations ont été confirmées par une étude du rapport TB/TP chez les brebis des lignées CCS en début de lactation.

Interpretive Summary

Somatic cell count–based selection reduces susceptibility to energy shortage during early lactation in a sheep model by J. Bouvier-Muller et al.

Mastitis is one of the most frequent and costly diseases in dairy ruminants. The existence of a genetic basis for mastitis susceptibility has been well documented. Growing evidence also indicates a relationship between severe negative energy balance and increased risk of mastitis in early lactation but little is known about the correlation between genetic resistance and the response to energy stress. The aim of this report was to characterize this interaction by combining transcriptomic and phenotypic data. Our results clearly confirmed a genetic link between genetic susceptibility to mastitis and metabolic adaptation to energy shortage.

Somatic cell count–based selection reduces susceptibility to energy shortage during early lactation in a sheep model

J. Bouvier-Muller,*†, C. Allain,*, F. Enjalbert,*, Y. Farizon,*, D. Portes,‡, G. Foucras,† and R. Rupp*[1]

* GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, INPT, ENVT, Castanet Tolosan, France

† Interactions Hôtes - Agents Pathogènes (IHAP), Université de Toulouse, ENVT, Toulouse, France

‡ Domaine de La Fage, INRA, Roquefort sur Soulzon, France

[1] Corresponding author: rachel.rupp@toulouse.inra.fr

Rachel RUPP

INRA GENPHYSE, 24 chemin de Borde Rouge, B.P. 52627

F-31326 Castanet Tolosan Cedex

Tel: 00 (33) 5 61 28 51 80

Fax: 00 (33) 5 61 28 53 53

ABSTRACT

During the transition from late gestation to early lactation, ruminants experience a negative energy balance (NEB) which is considered to increase susceptibility to mammary infections. Our previous study in two divergent lines of sheep selected for high and low Somatic Cell Score (SCS) had suggested an association between the response to NEB and genetic susceptibility to mastitis. Forty-eight early-lactation primiparous dairy ewes from the two SCS genetic lines were allocated to two homogeneous subgroups: a NEB group, which was energy restricted and received 60% of the energy requirements for 15 days and a control-fed group, to obtain 4 balanced groups of 12 ewes: High-SCS PEB, Low-SCS PEB, High-SCS NEB and Low-SCS NEB. High-SCS ewes showed greater weight loss and increased plasmatic concentrations of β-hydroxybutyrate (BHB) and non-esterified fatty acids (NEFA) than Low-SCS ewes, when confronted with an induced NEB.

The aim of this study was to further characterize this interaction by combining transcriptomic and phenotypic data with a generalized partial least square discriminant analysis using mixOmics package framework (block PLS-DA). A preliminary analysis using three blocks of phenotypes (fatty acids, weight and production, blood metabolites) revealed a high correlation between fat-to-protein ratio, BHB and NEFA concentrations with milk long-chain fatty acid yields. These phenotypes allowed good discrimination of the energy-restricted High-SCS ewes and confirmed a high level of adipose tissue mobilization in this group.

A second analysis, which included RNAseq data, revealed high correlations ($r>0.9$) between the long-chain fatty acid yields in milk and *PDK4*, *CPT1A*, *SLC25A20*, *KLF10* and *KLF11* expression, highlighting the relationship between mobilization of body reserves and enhanced fatty acids utilization for energy production in blood cells. Finally, analysis of milk

composition measured in 1,025 ewes from the two genetic lines over 10 years confirmed significant higher fat-to-protein ratio in High-SCS in early lactation.

Altogether, our results strongly confirmed a genetic link between susceptibility to mastitis and metabolic adaptation to energy shortage. Improving genetic resistance to mastitis using SCS should be accompanied by a favorable effect on the response to metabolic stress especially in highly stressful early lactation. Moreover, this study suggests that the fat-to-protein ratio could be used as a low-cost monitoring tool of energy balance and ketosis during this critical phase of lactation.

Key words: mastitis resistance, negative energy balance, dairy ruminant, data integration

INTRODUCTION

Mastitis is an inflammation of the mammary gland mainly caused by bacteria that proliferate in the gland lumen following colonization of the teat canal. This disorder is the most costly and frequent infectious disease of dairy cattle (Wells et al., 1998, Barkema et al., 2009) and sheep (Bergonier et al., 2003). 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 (Kehrli and Shuster, 1994 ; Sordillo, 2005), the protective mechanisms are still obscure. Literature data, however, corroborate the importance of a rapid influx of neutrophils and macrophages into the mammary gland, to allow effective and early clearance of the pathogen and to control the inflammatory process (Paape et al., 2002 ; Wellnitz and Bruckmaier, 2012). This massive cell recruitment in the udder leads to a dramatic increase in the milk somatic cell count (SCC). Accordingly, SCC has been widely advocated as an easy-to-measure tool for predicting mastitis and discriminating between chronically infected and non-infected animals (Kehrli and Shuster, 1994; Bergonier and Berthelot, 2003).

The existence of a genetic basis for mastitis susceptibility has been well documented in dairy ruminants (Mrode and Swanson, 1996; Heringstad et al., 2000; Rupp and Boichard, 2003). The estimated heritability of SCC, one of the most widely studied predictors, ranges from 10 to 20% (Rupp and Foucras, 2010) and is also genetically strongly positively correlated with resistance to mastitis. In this context, a divergent selection of Lacaune dairy sheep was developed based on extreme breeding values of the somatic cell score (SCS) (Rupp et al., 2009). In particular, milk bacteriology showed that the High SCS line has a higher rate of mammary infections in natural conditions, associated with a lower capacity for bacterial clearance during experimental challenges compared to the Low SCS line (Bonnefont et al., 2011).

The risk of dairy ruminants developing mastitis is increased during the periparturient period when most animals experience some degree of negative energy balance (NEB). This is due to a low feed intake relative to high energy demands for growth of the fetus and uterus, and milk synthesis especially in high-yielding animals (Drackley, 1999). The severity and duration of NEB leads to extensive mobilization of fatty acids (FA) from the adipose tissue and results in higher blood NEFA and/or BHB concentrations (Dann et al., 2006). There is growing evidence of a relationship between severe NEB, impairment of the immune response and an increased risk of mastitis in early lactation, in particular in dairy cows (Suriyasathaporn et al., 2000; Jánosi et al., 2003; Nyman et al., 2008).

A genetic association between mastitis susceptibility and energy metabolism was also suggested in a previous study in dairy ewes (Bouvier-Muller et al., 2016). This report described the consequences of experimentally-induced NEB during early lactation on production traits and metabolic response in High-SCS and Low-SCS ewes. A noteworthy interaction between genetic background and energy balance on metabolic parameters and body weight was demonstrated. High-SCS ewes showed a greater decrease in body weight and higher NEFA and BHB

concentrations than Low-SCS ewes when subjected to NEB. However, the mechanisms underlying the relationship between energy balance and mastitis susceptibility remained unclear.

In the present study, additional phenotypes such as milk FA composition and blood RNAseq transcriptomic profiling were scrutinized to provide additional insight into these mechanisms. A sparse Partial Least Squares - Discriminant Analysis (sPLS-DA) model, based on the integration of multiple phenotypes and transcriptomic datasets, was used to describe the interaction between genetic background for mastitis susceptibility and energy balance. Field data on the genetic lines were also analyzed in order to confirm our hypothesis of a genetic dependence of ketosis frequency in relation with susceptibility to mammary infection.

MATERIALS & METHODS

All procedures involving animals received approval from the Ethics Committee on Animal Experimentation of Toulouse (France), Agreement 01557/01.

Experimental design

A detailed description of the experimental design can be found in Bouvier-Muller et al. (2016). Briefly, forty-eight primiparous Lacaune ewes from each of two genetic lines, High and Low-SCS (Rupp et al., 2009) were allocated to two groups per line two weeks after lambing, according to milk yield, milk composition, BW and litter size. One group received a control (Positive Energy Balance: PEB) diet which met energy requirements, the other group (NEB) received a low energy diet which met only 60% of their energy requirements, resulting in four balanced groups of 12 ewes: High-SCS PEB, Low-SCS PEB, High-SCS NEB and Low-SCS NEB. Both diets met the protein requirements. After 10 days on either the NEB or PEB diet, the healthiest half-udder in all ewes was injected with a sterile solution of Pam3CSK4 (10 µg/ml,

InVivogen®, Toulouse, France) and muramyl dipeptide MDP (10 µg/ml InVivogen®, Toulouse, France) to induce local inflammation. As shown in **Figure 1**, the first day of restriction was referred as d0 in the experiment timeline.

Phenotypes and sample collection for blood metabolites analyses

A detailed description of the phenotypes collection can be found in Bouvier-Muller et al., (2016). Milk yield, fat, and protein contents and SCC were measured on d-2, 8 and 14. SCC were measured with a Fossomatic cell counter (Foss, Nanterre, France). Daily values of SCC, fat and protein contents were calculated as the average of the morning and evening milking values weighted by milk yield. The daily fat-to-protein ratio (F:P) was calculated from the daily averages for fat and protein contents. Daily SCC data were normalized as follows to give a daily SCS: SCS = 3 + log2 (SCC/100,000).

NEB was characterized by weighing the ewes on d−1, 8 and 14. During the restriction period, BW was corrected in NEB ewes by adding their average decrease in BW between d −1 and d1 (3.3 kg) to compensate for the decrease in digestive tract contents due to the lower dry matter intake. Body condition score (BCS) was assessed on d−10, 6 and 14 using the 5-point scale proposed by Russel et al. (1969). Blood was sampled from the jugular vein on d−3, 11 and 14 before the morning milking, and the serum analyzed for glucose, insulin, NEFA and BHB, as previously described by Bouvier-Muller et al. (2016).

Collection of fatty acids data

Milk samples for FA analysis were collected on d-2, 8 and 14 and methylated *in situ* using the procedure described by Jenkins (2010). Nonadecanoic acid (Sigma Co., St. Louis, MO) was used as the internal standard. FA methyl esters were quantified by GC (Agilent 6890N,

equipped with a model 7683 auto injector, Network GC System; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, California) using a fused silica capillary column (100 m × 0.25 mm i.d., 0.20-µm film thickness; CP-Sil 88; (Agilent Technologies). For analysis, the flame ionization detector temperature was maintained at 260°C and the injector at 255°C; the split ratio was 1:50. Hydrogen was used as the carrier gas with a constant flow of 1 mL/min. The samples were injected in 1 µL of hexane. The initial temperature of the oven was 60°C, which was maintained for 2 min; it was then increased by 8°C/min to 150°C, kept at 150°C for 12 min, increased by 2°C/min to 175°C, held at 175°C for 20 min, increased by 5°C/min to 225°C, held at 225°C for 10 min, and finally increased by 5°C/min to 240°C and maintained at 240°C for 10 min. Peaks were identified and quantified by comparison with commercial standards (Sigma, St. Louis, MO) except C18:1, trans-4 to trans 8-C18:1, trans-12 to trans-16-C18:1, cis-12-C18:1 and cis-15 C18:1 FA which were identified by order of elution as described in Troegeler-Meynadier et al. (2014). Odd-chain FA were summed as branched (*iso* and *anteiso* from C13:0 to C17:0) and straight-chain (from C7:0 to C17:0).

Fatty acid proportions were then multiplied by fat content, milk yield and 0.933, which is the fatty acids-to-fat content ratio in milk, (Glasser et al., 2007) in order to obtain fatty acid yields and analyze FA exportation to the milk.

Collection of RNA-seq data

Details on the collection of RNAseq data have been described by Bouvier-Muller et al. (2017). RNA-seq samples were collected from six ewes in each of the four groups (24 ewes in total). The ewes in these four subgroups were selected to be representative of the initial groups for milk production, BHB and NEFA concentrations. Briefly, blood samples were collected by jugular venipuncture at three time points (d-3, d11 and d12). Total RNA was isolated from blood

samples using the commercially available NucleoSpin® RNA Blood kit (Macherey-Nagel), according to the manufacturer's protocol. cDNA libraries were prepared from high quality RNA using an Illumina TruSeq RNA sample prep kit, following the manufacturer's instructions (Illumina, San Diego, CA, USA). Individual RNA-seq libraries were sequenced in triplicate at 100 bp/sequence paired-end reads using an Illumina HiSeq 2500 sequencer (Illumina, TruSeq PE Cluster Kit v3, cBot and TruSeq BS Kit v3) at the GenoToul genomic platform (Castanet-Tolosan, France). Input reads were aligned to the ovine reference genome (ENSEMBL v74) using STAR (v2.4.0). The alignments were sorted with Samtools (v0.1.19). Raw counts for the genes were obtained using the FeaturesCount software package and the ENSEMBL v74 annotation of the ovine genome. The R (3.3.1) package, DESeq2 (1.12.4), was applied to normalize the RNA-seq data, by using a negative binomial distribution to model biological and technical variance for the count data after removing any genes which had zero read counts for all samples.

Data integration and discriminant analysis

A supervised classification by sparse Partial Least Squares - Discriminant Analysis (sPLS-DA) was conducted to classify the group's segregation and to identify the most important phenotypes and genes that best discriminated the four groups, namely High-SCS PEB, Low-SCS PEB, High-SCS NEB and Low-SCS NEB. sPLS-DA was applied using the R (version 3.3.1) package MixOmics (version 1.6.3) that is dedicated to the integrative analysis of 'omics' data (Lê Cao et al., 2009).

sPLS-DA uses a matrix of features (X) and a group vector (factor), indicating the group of each sample, to select the most predictive or discriminative features (phenotypes or genes) in the

data that help classify the samples (Lê Cao et al., 2011). Unlike principal component analysis (PCA) which focuses on variance maximization of the features alone, the sPLS-DA models covariance maximization between the matrix of features and the factor to estimate the parameters of a linear regression model and therefore provide a regression extension of PCA. *Plotloading* was used to visualize the weights of each selected variable on each component and to determine the variables which best discriminated the groups in the different datasets.

Le Cao et al (2009) included more than two blocks of features in a generalized sPLS-DA to integrate multiple data sets measured on the same samples and classify a discrete outcome (block sPLS-DA or DIABLO; http://mixomics.org/mixdiablo/). From the regression framework, the scatterplot of given components allows method validation by checking that the correlation between blocks of features has been maximized by the method. The RV coefficient, which is a generalized Pearson correlation coefficient for matrices, may be used to estimate the correlation between two transformed blocks of features (Robert and Escoufier, 1976). The association between variables was computed using a similarity score, based on the coordinates of the variables on the axis defined by the principal components. *Correlation circle plots* were used to visualize these correlations between variables of different blocks.

First, sPLS-DA was used to integrate three-block datasets, namely the blood metabolite (NEFA, BHB, glucose, insulin), the production traits (BCS, weight, milk yield, milk protein yield, fat yield, protein content, fat content, fat-to-protein ratio, milk SCS) and the milk FA composition datasets in 48 ewes using three time points (d-3, d11 and d12). The stability of the estimated error rates to the number of variables in the milk FA dataset had been previously plotted to determine the number of variables to keep for the sPLS-DA analysis. Thus ten variables in this dataset were retained for the sPLS-DA analysis.

A meta-phenotype dataset was created with the blood metabolites dataset, the production traits dataset, and the ten milk FA yields chosen during the first sPLS-DA analysis. A second sPLS-DA was carried out on this new meta-phenotype block dataset and the normalized RNA-seq dataset in 24 ewes (6 ewes from each of the four groups) using the same three time points as above. As in the first analysis, the stability of the estimated error rates according to the number of variables in the RNA-seq dataset had been previously plotted and ten genes had been retained for this second analysis.

Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Eight genes were assessed by RT-qPCR on blood samples from the 24 ewes, that had not been used for RNA-seq. Quantitative PCR and data processing were as reported by Bouvier-Muller et al. (2017). Specific details of primer design can been found in Subdata 1. Analyses of variance using linear mixed models with the R (version 3.1.2) Bioconductor package nlme (version 3.1) were applied to determine the effects of the group on gene expression obtained by qPCR. To test the effect of the group, the model included the fixed effects of date (DATE; D-4, D11 H0, D11 H24) and group (GROUP; High-SCS PEB, Low-SCS PEB, High-SCS NEB and Low-SCS NEB) and an individual milk production reference (milkref). For each ewe, milkref was the average of the last three milk yields recorded before energy restriction. Statistical differences were declared as significant and highly significant at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively. Trends toward significance at $P<0.10$ were open to discussion.

Field data analysis for fat-to-protein ratio

Records of milk production and SCC were obtained during the official milk recording in High and Low-SCS lines of ewes at the INRA experimental facility of La Fage (UE321, Roquefort.

France). Lambs were breastfed during a three week period. Ewes were then milked twice a day and the official milk recordings were therefore available from 28 DIM onwards. The milk production traits recorded were test-day milk yield, fat and protein contents at the morning milking, measured every 3 wks, from 28 to 220 DIM. However, two time points in early lactation (morning test-days), at 6 and 20 DIM on average were also available for 70 primiparous ewes. Thus, a total of 16,402 test-days from 1025 primiparous and 715 multiparous ewes recorded between 2005 and 2016 were available. Analyses were conducted separately on primiparous and multiparous ewes. A linear mixed model (proc MIXED, SAS®) was used to test the effect of genetic lines on repeated measures of fat-to-protein ratio with special attention paid to early lactation. The following fixed effects were tested: genetic line, DIM (10 at three-week intervals from 6 to 220 DIM), parity (in multiparous ewes), year, milk production, number of suckled lambs (1 vs 2 or more) and all interactions terms including the genetic line x DIM interaction.

RESULTS

Phenotypic data integration

sPLS-DA was used to integrate the blood metabolites, production traits and milk FA composition datasets. The purpose of this analysis was to identify the phenotypes which most readily discriminated the four groups, namely High-SCS PEB, Low-SCS PEB, High-SCS NEB and Low-SCS NEB on 48 ewes using the three time points. Percentages of variance that explain the first and the second PC were respectively 0.61 and 0.22 in the metabolite dataset, 0.54 and 0.28 in the fatty acids dataset and 0.4 and 0.27 in the production traits dataset.

Figure 2 shows the weight of the variables in the first PC, which best separated the four groups. Fat content, fat-to-protein ratio, fat yield and BHB and NEFA concentrations were the most discriminant variables in the production trait and the blood metabolite datasets, respectively. Long-chain FA (such as *cis*9-C18:1, C17:0, C18:0, *anteiso* C17:0 and C16:1) yields were the most informative variables in the milk FA dataset. These variables contributed the most to distinguish High-SCS NEB ewes from the three other groups according to the sPLS-DA analysis.

This analysis revealed a high correlation between the three datasets, with RV coefficients ranging from 0.8 to 0.94. **Figure 3** shows the correlations between the variables from the three different blocks. Cutoff was set at 0.9 to ensure clarity. The correlation table is displayed in **Subdata** 2. BHB and NEFA concentrations were highly positively correlated with fat-to-protein ratio (0.79 and 0.91, respectively), fat content (0.72 and 0.84, respectively) and with milk long-chain FA yields (C16:1, C17:0, *anteiso* and *iso* C17:0, C18:0, *cis-9* C18:1, *cis-11* C18:1+*trans-15* C18:1 and *trans*-9 C18.1) with correlations ranging between 0.73 and 0.91. In accordance, the fat yield and the fat-to-protein ratio were positively correlated with these long-chain FA yields with correlations ranging from 0.61 to 0.93. However, glucose concentration was negatively correlated with these long-chain FA yields with correlation ranging between 0.7 and 0.8. Insulin

concentration was negatively correlated with milk short-chain FA yields (C6:0, C7:0, C8:0, C9:0, C10:0, C11:0, C12:0 and C13:0) with correlations ranging between 0.69 and -0.86 whereas milk and protein yields were positively correlated with these milk FA yields with correlations ranging between 0.71 and 0.92. Glucose and insulin concentrations were also negatively correlated with milk, fat and protein yields with correlations ranging between -0.69 and -0.91.

The ten milk FA yields highlighted during the first analysis (C16:1, C17.0, *anteiso* and *iso* C17:0, C18:0, *cis-11* C18:1+*trans-15* C18:1, *cis-9* C18:1, trans-9_C18:1, odd branched FA, and odd unbranched FA) were pulled with the production traits dataset and the blood metabolite dataset to create a new meta-phenotype dataset for the next step.

Genes and phenotypes integration

The second step was to identify those genes which best discriminated the four groups in relation to phenotypic data by performing a second sPLS-DA which included both meta-phenotype and gene count information. The RNA-seq dataset included 20,017 normalized genes. sPLS-DA was applied to integrate the two datasets on 24 ewes (six from each of the four groups) using the three time points. Percentages of variance that explain the first and the second PC were respectively 0.02 and 0.04 in the gene dataset, 0.68 and 0.12 in the meta-phenotype dataset.

Figure 4 shows the phenotypes and the genes which best separated the four groups on PC1. NEFA and BHB concentrations, fat-to-protein ratio, fat yield, fat content, *cis* and *trans-9* C18:1, C17:0, C18:0, *anteiso* C17:0, odd unbranched FA, C16:1, *cis-11* C18:1+*trans-15* C18:1, odd branched FA, and *iso* C17.0 yields were the most discriminant variables in the phenotypes dataset whereas *PDK4*, *FCGRT*, *CPT1A*, *KLF11*, *VSIG10L*, *SLC25A20* and *KLF10* were the most discriminant genes. These were the main variables contributing to distinguish the High-SCS NEB ewes from the three other groups according to the sPLS-DA analysis (cf Figure 4).

The RV coefficient between the two transformed datasets was 0.77, indicating a lower correlation than previously observed. Correlations higher than 0.9 between phenotypes and genes are shown in **Figure 5**. *PDK4*, *FCGRT*, *KLF11, VSIG10L, KLF10, SLC25A20* and *CPT1A* expressions were highly positively correlated with milk long-chain FA yields (C16:1, C17:0, *anteiso* and *iso* C17:0, C18:0, *cis* and *trans-9* C18:1, *cis-11* C18:1+*trans-15* C18:1, odd unbranched FA and odd branched FA) and fat yield with correlations ranging between 0.71 and 0.96. Noteworthy, *FCGRT*, *KLF11* and *CPT1A* expressions were positively correlated with fat yield, fat-to-protein ratio and BHB and NEFA concentrations, the correlations ranging between 0.73 and 0.90. The correlation table is displayed in Subdata 3.

qPCR validation of the genes identified by sPLS-DA analysis

Real-time qPCR was used to confirm the difference in expression of seven genes (*PDK4*, *FCGRT*, *CPT1A*, *KLF11*, *VSIG10L*, *SLC25A20* and *KLF10*) identified between the four groups during the sPLS-DA analysis. . Gene expressions were tested on blood samples from the 24 ewes which had not been sequenced with the RNA-seq technique or used during the sPLS-DA analysis. The effect of group was significant or close to significance for *PDK4*, *CPT1A*, *FCGRT*, *KLF10* and *KLF11* expression (Table 1).

Difference between genetic lines for fat-to-protein ratio

Figure 6 shows fat-to-protein ratio (lsmeans ± SE) according to DIM and the genetic line measured in 1025 ewes from 2005 to 2016. Results of the analysis of variance are given in Subdata 4. The fat-to-protein ratio was significantly ($p \leq 0.05$) higher in High-SCS ewes than in Low-SCS ewes during early lactation (DIM <100). The difference between lines was largest in

the earliest stage (average DIM = 6 in primiparous ewes) but data were limited. Effects of DIM, year, milk production, and number of suckled lambs were also significant.

DISCUSSION

Mobilization of body reserves highlighted through multiple phenotypes and gene expressions

NEB around parturition is known to lead to extensive mobilization of adipose triacylglycerols to meet energy requirements. These mobilized adipose tissue triacylglycerols result in high concentrations of plasma NEFA which can be taken up by the liver and oxidized to produce ketone bodies (Dann et al., 2006; Goff, 2006). In the present study, NEFA and BHB were highly positively correlated with fat-to-protein ratio and fat content, in accordance with Grieve et al., (1986). These authors indeed demonstrated that the estimated energy balance in dairy cows was negatively correlated with milk fat % (-0.07 to -0.65), positively correlated with milk protein % (0.12 to 0.47) and negatively correlated with the ratio of milk fat to protein (-0.36 to -0.74) across data sets. For a fat-to-protein ratio greater than 1.5, the sensitivity and specificity to detect an NEB were over 40% and around 90%, respectively (Heuer et al., 2000). According to their study and our results, the fat-to-protein ratio would therefore be a good predictor of energy status in dairy ewes and cows.

NEFA and BHB concentrations were also highly positively correlated with milk long-chain FA yields (C16:1, C17:0, *anteiso* and *iso* C17:0, C18:0, *cis* and *trans-9* C18:1 and *cis-11* C18:1+*trans-15* C18:1). Individual FA in cow milk are derived from different sources (e.g., arterial uptake and *de novo* mammary gland synthesis). Even FA with chain lengths from C4 to C16 are produced de novo in the mammary gland from acetic and butyric acids originating from ruminal digestion of carbohydrates (Månsshyon, 2008). Odd- and branched-chain FA (OBCFA: C15:0, *iso* C15:0, *anteiso* C15:0, C17:0, *iso* C17:0, *anteiso* C17:0, and C17:1) are synthesized by ruminal bacteria and influenced indirectly by the diet (Vlaeminck et al., 2005), whereas long-chain FA (including C16:0) and polyunsaturated FA (PUFA) are taken up by the mammary gland

from the arterial blood, and originate either from the digestive tract or from adipose tissue. As a result, the concentrations of individual FA in milk fat are dependent on the diet which modulates both the FA profile of absorbed FA (Glasser alt al., 2008, 2:691) and adipose tissue mobilization (Gross et al. 2011).

In our study, the fat-to-protein ratio was positively correlated with some major milk long-chain FA yields (C16:1, C18:0, *cis*-9 C18:1) including intermediates from the ruminal biohydrogenation of dietary unsaturated FA (*trans*-9 C18:1 and *cis-11* C18:1+*trans-15* C18:1) as reported by Stoop et al., (2009) who showed that a large deviation in the fat-to-protein ratio was associated with an increase in C16:0 and C18:0 milk concentration. Gross et al. (2011) studied the effect of a 49 % energy restriction in 30 dairy cows at 100 DIM. In their study, oleic acid *cis* 9 C18:1 was significantly increased during the induced NEB indicating that a considerable amount of adipose tissue had been mobilized. According to Van Haelst et al. (2008), an increased proportion of *cis-9* 18:1 in milk is of particular interest for the prediction of subclinical ketosis, because the percentage of this FA in milk fat is high prior to the diagnosis of ketosis. Fat-to-protein ratio, NEFA and BHB concentrations were also positively correlated with OBCFA (C17:0, *anteiso* and *iso* C17:0). As each of these FAs represents 0.4 to 0.8% of the adipose tissue FA in cattle (Gómez et al., 2015), an increased milk yield might be due to an increase in tissue fat mobilization. Moreover, *iso* and *anteiso* C17:0 are mainly synthesized in the rumen with branched aminoacids as precursors (Keeney et al., 1962; Vlaeminck et al., 2005). In our experiment, as energy restriction was not accompanied by protein restriction, branched chain amino-acids were not limiting. Although branched C17:0 were not examined in previous investigations of the relationship between NEB and the milk FA profile (Van Halest *et al.*, 2008; Stoop et al., 2009; Gross et al., 2011), Gross et al. (2011) reported an increased proportion of *cis*-

9 C17:1, derived from mammary desaturation of C17:0, in the milk of cows subjected to a dietary restriction.

Thus, according to our results, the fat-to-protein ratio, NEFA and BHB concentrations and long-chain FA constituted a robust set of phenotypes related to metabolic response. Our second analysis revealed that this set was positively correlated with *PDK4*, *FCGRT*, *KLF11*, *KLF10*, *SLC25A20* and *CPT1A* expressions. We had already shown the significant effects of energy restriction on *CPT1A* and *PDK4* expression in blood cells in a previous study (Bouvier-Muller et al., 2017). CPT1A is indeed a key regulatory enzyme in fatty acid oxidation as it catalyzes the formation of long-chain acyl-carnitine, which can then pass through the inner mitochondrial membrane and be used for β-oxidation in the mitochondria. *SLC25A20* encodes for carnitine-acylcarnitine translocase which is responsible for transporting both carnitine-fatty acid complexes and carnitine across the inner mitochondrial membrane. This gene, like CPT1A, seems to be essential to the fatty acid-oxidation pathway and utilization of FA as fuel sources. Moreover, *PDK4* expression was highly positively correlated with our phenotypes of interest. PDK4 inactivates pyruvate dehydrogenase (PDH), inhibiting the utilization of pyruvate for acetyl-CoA synthesis, hence blocking glucose oxidation and favoring fatty acid oxidation for energy production (Harris et al., 2002).

Similarly to *PDK4* and *CPT1A*, *KLF10* and *KLF11* are under the control of transcription factor PPARα (Rakhshandehroo et al., 2009 ; Song et al., 2010), which belongs to the nuclear hormone receptor superfamily and has been identified as a master regulator of lipid metabolism in liver (Kersten et al., 2000 ; Mandard et al., 2004). KLF proteins bind to the GC box or CACCC boxes of genes involved in key biological cellular functions including cell proliferation, differentiation and apoptosis. However, KLF10 and KLF11 have also been

established as transcriptional regulators of hepatic lipid homeostasis (Guillaumond et al., 2010 ; Zhang et al., 2013). In particular, KLF11 might have stimulatory effects on the expression of genes involved in fatty acid oxidation (Zhang et al., 2013), which is consistent with our results.

FCGRT expression was also highly positively correlated with our phenotypes of interest. This gene encodes the receptor FcRn that binds the Fc region of monomeric immunoglobulin G. This protein is involved in transporting maternal immunity within the mammary lumen for colostrum synthesis (Story et al., 1994) and protects IgG from fast degradation throughout life (Chaudhury et al., 2003). FcRn therefore plays a crucial role in the metabolism of IgG in cattle, as reported by Cervenak and Kacskovics (2009). However, to our knowledge, there is no explanation in the literature of the link between *FCGRT* expression and lipid metabolism. Further studies are needed to understand this possible relationship.

Enhanced sensitivity to energy restriction of High-SCS ewes revealed through a data integration approach

Altogether, the integration of phenotypic and transcriptomic data provided firm and consistent results on the relationship between metabolic parameters. All the described variables in this robust set of metabolic parameters contributed to distinguish the High-SCS energy-restricted ewes from the other groups, in accordance with our previous study which evidenced an interaction between genetic background and energy balance based solely on weight, BHB and NEFA (Bouvier-Muller et al., 2016). Indeed, High-SCS ewes showed a greater decrease in body weight and higher NEFA and BHB concentrations than Low-SCS ewes when subjected to energy

restriction. The present study confirmed that greater mobilization of adipose tissue occurred in High-SCS ewes than in Low-SCS ewes as reflected by the high value of the milk long-chain FA used to discriminate energy-restricted High-SCS ewes. These results strongly suggest that long-chain FA were exported from adipose tissue to the blood and accumulated in the mammary gland, leading, in particular, to an increase in the fat yield and fat-to-protein ratio of the milk. The considerable increase in blood NEFA concentration also led to enhanced fatty acid oxidation in the blood cells, as reflected by the importance of *PDK4*, *CPT1A*, *SLC25A20*, *KLF10* and *KLF11* expression in discriminating energy-restricted High-SCS ewes from the other three groups.

Fat-to-protein ratio was highly positively correlated with metabolic parameters related to energy balance in early lactation and seemed to provide a cheap and easy tool for characterizing a negative energy balance during this period. The expanded dataset showed that fat-to-protein ratio was also significantly higher in High-SCS ewes than in Low-SCS ewes during the first two months of lactation. As the model also included the effect of milk production, this difference was not due to a difference in milk production. In addition, the rams used to create the divergent Low-SCS and High-SCS lines were chosen for their similar and favorable EBV for milk production to avoid confounding effects due to an indirect response to selection for production traits. Altogether, these results confirmed our assumption that High-SCS ewes are more sensitive to energy restriction than Low-SCS ewes in early lactation, irrespective of their milk production level. In accordance, Koeck et al. (2014) determined the genetic parameters for milk BHB of Canadian Holstein cows in early first lactation and examined their genetic association with SCS. The authors showed a moderate positive genetic correlation between milk BHB on the first test-day and the SCS in early lactation (0.19 for 5–20 DIM, and 0.11 for 21–40 DIM). Similarly, Zwald et al., (2004) calculated the genetic correlations between health traits from 161,622 cows in 646 herds and reported a modest but significant correlation (0.17) between mastitis and ketosis

suggesting a partially shared genetic predisposition for these diseases. Altogether, these results confirmed that selection for low-SCS involves having animals more robust, with potentially fewer metabolic disorders such as ketosis, and a better response to negative energy balance in early lactation.

CONCLUSIONS

Integration of transcriptomic and phenotypic data revealed high correlations between the fat-to-protein ratio, BHB and NEFA concentrations, milk long-chain FA yields and the expression of genes involved in fatty acid oxidation and its regulation. Although these correlations were already well known in dairy cattle, this is the first report to describe a phenotypic and transcriptomic integrative characterization of energy restriction in dairy ewes.

These metabolic parameters and genes contributed to distinguish the response to energy restriction of ewes selected for high or low SCS, suggesting that ewes genetically susceptible to mastitis were more sensitive to energy restriction than genetically resistant ewes. The results confirmed the hypothesis of a favorable genetic association between resistance to mastitis and metabolic adaptation to energy shortage and suggested new ways for genetic improvement in dairy ruminants. In particular, this study suggests that the fat-to-protein ratio could be used as a low-cost monitoring tool of poor health during the most critical phases of lactation and as an important indicator trait to improve robustness in dairy ruminants through selection.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the RUMINFLAME project, as part of the INRA MetaProgramme *Gestion Intégrée de la Santé Animale* (GISA). Gratitude is extended to the technical staff of La Fage experimental farm for assisting with technical support, animal care and data collection.

REFERENCES

Barkema, H.W., M.J. Green, A.J. Bradley, and R.N. Zadoks. 2009. Invited review: The role of contagious disease in udder health. J. Dairy Sci. 92:4717–4729. doi:10.3168/jds.2009-2347.

Bergonier, D., and X. Berthelot. 2003. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. Livest. Prod. Sci. 79:1–16. doi:10.1016/S0301-6226(02)00145-8.

Bergonier, D., R. de Crémoux, R. Rupp, G. Lagriffoul, and X. Berthelot. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. Vet. Res. 34:689–716. doi:10.1051/vetres:2003030.

Bonnefont, C.M., M. Toufeer, C. Caubet, E. Foulon, C. Tasca, M.-R. Aurel, D. Bergonier, S. Boullier, C. Robert-Granié, G. Foucras, and R. Rupp. 2011. Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus. BMC Genomics 12:1–16. doi:10.1186/1471-2164-12-208.

Bouvier-Muller, J., C. Allain, F. Enjalbert, G. Tabouret, D. Portes, C. Caubet, C. Tasca, G. Foucras, and R. Rupp. 2016. Response to dietary-induced energy restriction in dairy sheep divergently selected for resistance or susceptibility to mastitis. J. Dairy Sci. 99:480–492. doi:10.3168/jds.2015-9785.

Bouvier-Muller, J., C. Allain, G. Tabouret, F. Enjalbert, D. Portes, C. Noirot, R. Rupp, and G. Foucras. 2017. Whole blood transcriptome analysis reveals potential competition in metabolic pathways between negative energy balance and response to inflammatory challenge. Sci. Rep. 7:2379. doi:10.1038/s41598-017-02391-y.

Cervenak, J., and I. Kacskovics. 2009. The neonatal Fc receptor plays a crucial role in the metabolism of IgG in livestock animals. Vet. Immunol. Immunopathol. 128:171–177. doi:10.1016/j.vetimm.2008.10.300.

Chaudhury, C., S. Mehnaz, J.M. Robinson, W.L. Hayton, D.K. Pearl, D.C. Roopenian, and C.L. Anderson. 2003. The Major Histocompatibility Complex–related Fc Receptor for IgG (FcRn) Binds Albumin and Prolongs Its Lifespan. J. Exp. Med. 197:315–322. doi:10.1084/jem.20021829.

Dann, H.M., N.B. Litherland, J.P. Underwood, M. Bionaz, A. D'Angelo, J.W. McFadden, and J.K. Drackley. 2006. Diets During Far-Off and Close-Up Dry Periods Affect Periparturient Metabolism and Lactation in Multiparous Cows1. J. Dairy Sci. 89:3563–3577. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72396-7.

Drackley, J.K. 1999. Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier?. J. Dairy Sci. 82:2259–2273. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75474-3.

Glasser, F., M. Doreau, A. Ferlay, and Y. Chilliard. 2007. Technical note: Estimation of milk fatty acid yield from milk fat data. J. Dairy Sci. 90:2302–2304. doi:10.3168/jds.2006-870.

Goff, J.P. 2006. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. J. Dairy Sci. 89:1292–1301. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72197-X.

Gómez, I., J.A. Mendizabal, M.V. Sarriés, K. Insausti, P. Albertí, C. Realini, M. Pérez-Juan, M.A. Oliver, A. Purroy, and M.J. Beriain. 2015. Fatty acid composition of young Holstein bulls fed whole linseed and rumen-protected conjugated linoleic acid enriched diets. Livest. Sci. 180:106–112. doi:10.1016/j.livsci.2015.07.023.

Grieve, D.G., S. Korver, Y.S. Rijpkema, and G. Hof. 1986. Relationship between milk composition and some nutritional parameters in early lactation. Livest. Prod. Sci. 14:239–254. doi:10.1016/0301-6226(86)90083-7.

Gross, J., H.A. van Dorland, R.M. Bruckmaier, and F.J. Schwarz. 2011. Milk fatty acid profile related to energy balance in dairy cows. J. Dairy Res. 78:479–488. doi:10.1017/S0022029911000550.

Guillaumond, F., A. Gréchez-Cassiau, M. Subramaniam, S. Brangolo, B. Peteri-Brünback, B. Staels, C. Fiévet, T.C. Spelsberg, F. Delaunay, and M. Teboul. 2010. Krüppel-Like Factor KLF10 Is a Link between the Circadian Clock and Metabolism in Liver. Mol. Cell. Biol. 30:3059–3070. doi:10.1128/MCB.01141-09.

Harris, R.A., M.M. Bowker-Kinley, B. Huang, and P. Wu. 2002. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex. Adv. Enzyme Regul. 42:249–259. doi:10.1016/S0065-2571(01)00061-9.

Heringstad, B., G. Klemetsdal, and J. Ruane. 2000. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. Livest. Prod. Sci. 64:95–106. doi:10.1016/S0301-6226(99)00128-1.

Heuer, C., W.M. Van Straalen, Y.H. Schukken, A. Dirkzwager, and J.P.T.M. Noordhuizen. 2000. Prediction of energy balance in a high yielding dairy herd in early lactation: model development and precision. Livest. Prod. Sci. 65:91–105. doi:10.1016/S0301-6226(99)00177-3.

Jánosi, S., M. Kulcsár, P. Kóródi, L. Kátai, J. Reiczigel, S.J. Dieleman, J.A. Nikolic, G. Sályi, P. Ribiczey-Szabó, and G. Huszenicza. 2003. Energy imbalance related predisposition to mastitis in group-fed high-producing postpartum dairy cows. Acta Vet. Hung. 51:409–424. doi:10.1556/AVet.51.2003.3.14.

Jenkins, T.C. 2010. Technical note: common analytical errors yielding inaccurate results during analysis of fatty acids in feed and digesta samples. J. Dairy Sci. 93:1170–1174. doi:10.3168/jds.2009-2509.

Keeney, M., I. Katz, and M.J. Allison. 1962. On the probable origin of some milk fat acids in rumen microbial lipids. J. Am. Oil Chem. Soc. 39:198–201. doi:10.1007/BF02635818.

Kehrli, M.E., and D.E. Shuster. 1994. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. J. Dairy Sci. 77:619–627. doi:10.3168/jds.S0022-0302(94)76992-7.

Kersten, S., B. Desvergne, and W. Wahli. 2000. Roles of PPARs in health and disease. Nature 405:421–424. doi:10.1038/35013000.

Koeck, A., J. Jamrozik, F.S. Schenkel, R.K. Moore, D.M. Lefebvre, D.F. Kelton, and F. Miglior. 2014. Genetic analysis of milk β-hydroxybutyrate and its association with fat-to-protein ratio, body condition score, clinical ketosis, and displaced abomasum in early first lactation of Canadian Holsteins. J. Dairy Sci. 97:7286–7292. doi:10.3168/jds.2014-8405.

Lê Cao, K.-A., S. Boitard, and P. Besse. 2011. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. BMC Bioinformatics 12:253. doi:10.1186/1471-2105-12-253.

Lê Cao, K.-A., I. González, and S. Déjean. 2009. integrOmics: an R package to unravel relationships between two omics datasets. Bioinforma. Oxf. Engl. 25:2855–2856. doi:10.1093/bioinformatics/btp515.

Mandard, S., M. Müller, and S. Kersten. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. Cell. Mol. Life Sci. CMLS 61:393–416. doi:10.1007/s00018-003-3216-3.

Månsson, H.L. 2008. Fatty acids in bovine milk fat. Food Nutr. Res. 52:1821. doi:10.3402/fnr.v52i0.1821.

Mrode, R.A., and G.J.T. (Animal D.C. 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. U. K.

Nyman, A.-K., U. Emanuelson, K. Holtenius, K.L. Ingvartsen, T. Larsen, and K.P. Waller. 2008. Metabolites and immune variables associated with somatic cell counts of primiparous dairy cows. J. Dairy Sci. 91:2996–3009. doi:10.3168/jds.2007-0969.

Paape, M., J. Mehrzad, X. Zhao, J. Detilleux, and C. Burvenich. 2002. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 7:109–121.

Rakhshandehroo, M., G. Hooiveld, M. Müller, and S. Kersten. 2009. Comparative Analysis of Gene Regulation by the Transcription Factor PPARα between Mouse and Human. PLOS ONE 4:e6796. doi:10.1371/journal.pone.0006796.

Robert, P., and Y. Escoufier. 1976. A Unifying Tool for Linear Multivariate Statistical Methods: The RV-Coefficient. J. R. Stat. Soc. Ser. C Appl. Stat. 25:257–265. doi:10.2307/2347233.

Rupp, R., D. Bergonier, S. Dion, M.C. Hygonenq, M.R. Aurel, C. Robert-Granié, and G. Foucras. 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.

Rupp, R., and D. Boichard. 2003. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. Vet. Res. 34:18. doi:10.1051/vetres:2003020.

Rupp, R., and G. Foucras. 2010. Genetics of mastitis in dairy ruminants. 3rd ed. S.C. Bishop, R.F.E. Axford, F.W. Nicholas, and J.B. Owen, ed. CABI, Wallingford.

Russel, A.J.F., J.M. Doney, and R.G. Gunn. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. J. Agric. Sci. 72:451–454. doi:10.1017/S0021859600024874.

Song, S., R.R. Attia, S. Connaughton, M.I. Niesen, G.C. Ness, M.B. Elam, R.T. Hori, G.A. Cook, and E.A. Park. 2010. Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha) and PPAR gamma coactivator (PGC-1alpha) induce carnitine palmitoyltransferase IA (CPT-1A) via independent gene elements. Mol. Cell. Endocrinol. 325:54–63. doi:10.1016/j.mce.2010.05.019.

Sordillo, L.M. 2005. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. Livest. Prod. Sci. 98:89–99. doi:10.1016/j.livprodsci.2005.10.017.

Stoop, W.M., H. Bovenhuis, J.M.L. Heck, and J. a. M. van Arendonk. 2009. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. J. Dairy Sci. 92:1469–1478. doi:10.3168/jds.2008-1468.

Story, C.M., J.E. Mikulska, and N.E. Simister. 1994. A major histocompatibility complex class I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus. J. Exp. Med. 180:2377–2381.

Suriyasathaporn, W., C. Heuer, E.N. Noordhuizen-Stassen, and Y.H. Schukken. 2000. Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. Vet. Res. 31:397–412. doi:10.1051/vetres:2000128.

Troegeler-Meynadier, A., S. Puaut, Y. Farizon, and F. Enjalbert. 2014. Effects of the heating process of soybean oil and seeds on fatty acid biohydrogenation in vitro. J. Dairy Sci. 97:5657–5667. doi:10.3168/jds.2013-7783.

Van Haelst, Y.N.T., A. Beeckman, A.T.M. Van Knegsel, and V. Fievez. 2008. Short communication: elevated concentrations of oleic acid and long-chain fatty acids in milk fat of multiparous subclinical ketotic cows. J. Dairy Sci. 91:4683–4686. doi:10.3168/jds.2008-1375.

Vlaeminck, B., C. Dufour, A.M. van Vuuren, A.R.J. Cabrita, R.J. Dewhurst, D. Demeyer, and V. Fievez. 2005. Use of Odd and Branched-Chain Fatty Acids in Rumen Contents and Milk as a Potential Microbial Marker. J. Dairy Sci. 88:1031–1042. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72771-5.

Wellnitz, O., and R.M. Bruckmaier. 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. Vet. J. Lond. Engl. 1997 192:148–152. doi:10.1016/j.tvjl.2011.09.013.

Wells, S.J., S.L. Ott, and A.H. Seitzinger. 1998. Key health issues for dairy cattle--new and old. J. Dairy Sci. 81:3029–3035.

Zhang, H., Q. Chen, M. Yang, B. Zhu, Y. Cui, Y. Xue, N. Gong, A. Cui, M. Wang, L. Shen, S. Zhang, F. Fang, and Y. Chang. 2013. Mouse KLF11 regulates hepatic lipid metabolism. J. Hepatol. 58:763–770. doi:10.1016/j.jhep.2012.11.024.

Zwald, N.R., K.A. Weigel, Y.M. Chang, R.D. Welper, and J.S. Clay. 2004. Genetic Selection for Health Traits Using Producer-Recorded Data. II. Genetic Correlations, Disease Probabilities, and Relationships with Existing Traits. J. Dairy Sci. 87:4295–4302. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73574-2.

Table 1. Analysis of variance (linear mixed model) to test the group effect in High-SCS ewes in Positive Energy Balance (HSCS PEB, n=6), Low-SCS ewes in PEB (LSCS PEB, n=6), High-SCS ewes in Negative Energy Balance (HSCS NEB, n=6) and Low-SCS ewes in NEB (LSCS NEB, n=12) on RT-qPCR data. Model included time point and milkref.

Effect	CPT1A	SLC25A20	VSIG10L	FCGRT	PDK4	KLF10	KLF11	LRP12
Group	4.4E-04	0.12	0.88	0.07	2.011E-03	0.10	0.02	0.37
Time point	6.2E-03	0.09	0.22	0.18	0.13	0.06	1.1E-03	0.18
Milkref	1.2E-08	1.4E-06	0.10	5.2E-07	3.9E-05	1.5E-05	2.9E-09	2.4E-03

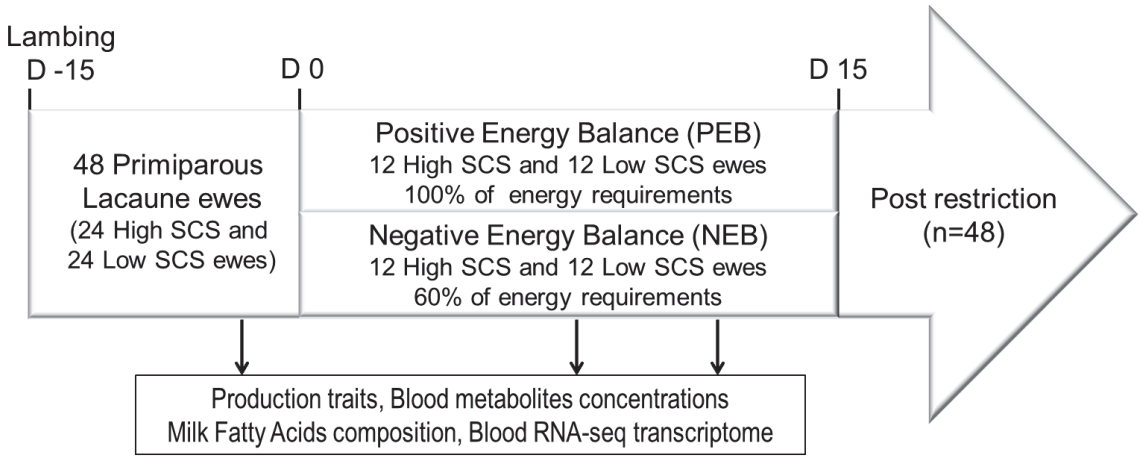


Figure 1. Experiment timeline

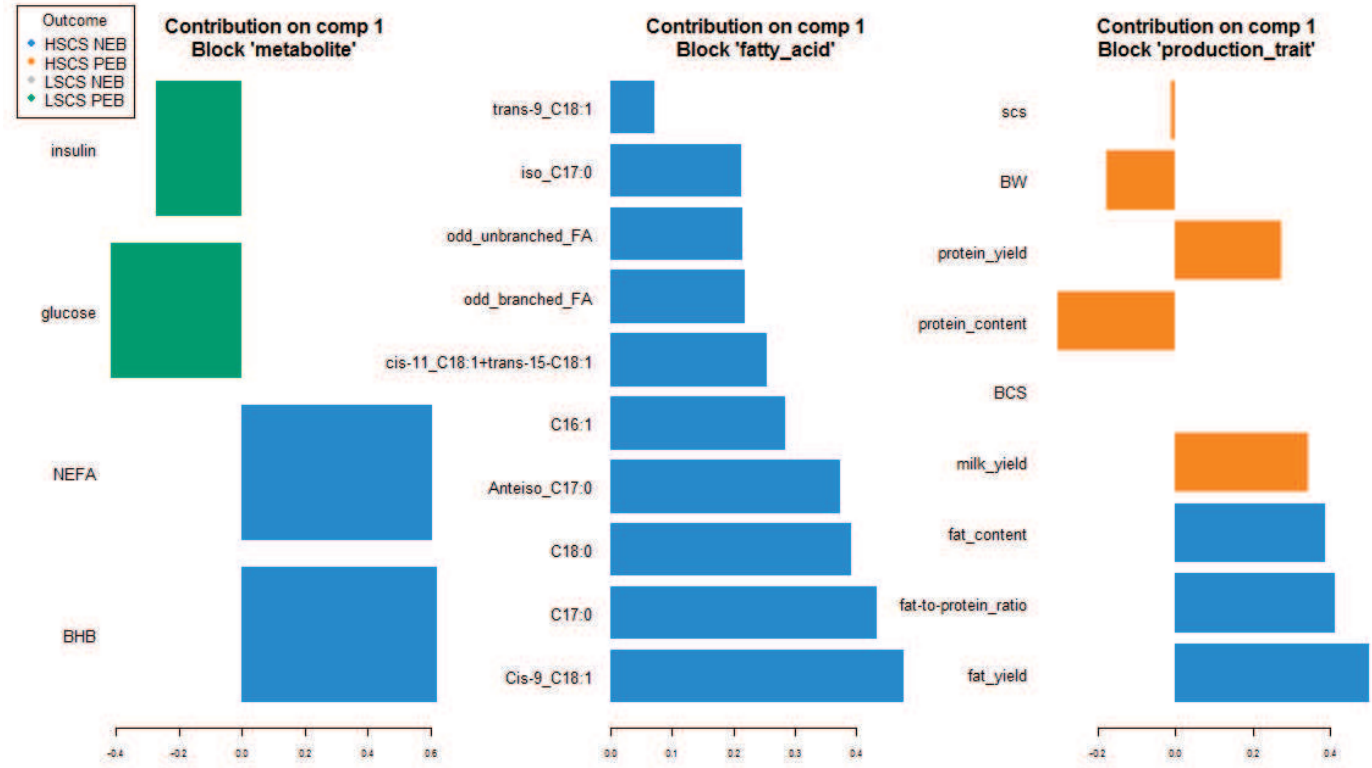


Figure 2. Visualization after a supervised classification by sparse Partial Least Squares - Discriminant Analysis of the variables which best discriminate the four groups: High-SCS ewes in Positive Energy Balance (HSCS PEB, n=12, orange), Low-SCS ewes in PEB (LSCS PEB, n=12, green), High-SCS in Negative Energy Balance (HSCS NEB, n=12, blue) and Low-SCS in NEB (LSCS NEB, n=12, grey). The figure shows the variables weight (numerical scale) on the first PC in three blocks of dataset: plasma metabolite concentrations, milk fatty acids yields and production traits dataset. Percentage of variance that explains first PC was 0.61 in the metabolite dataset, 0.54 in the fatty acids dataset and 0.4 in the production traits dataset, respectively. The analysis displayed was done for 48 ewes at three time points.

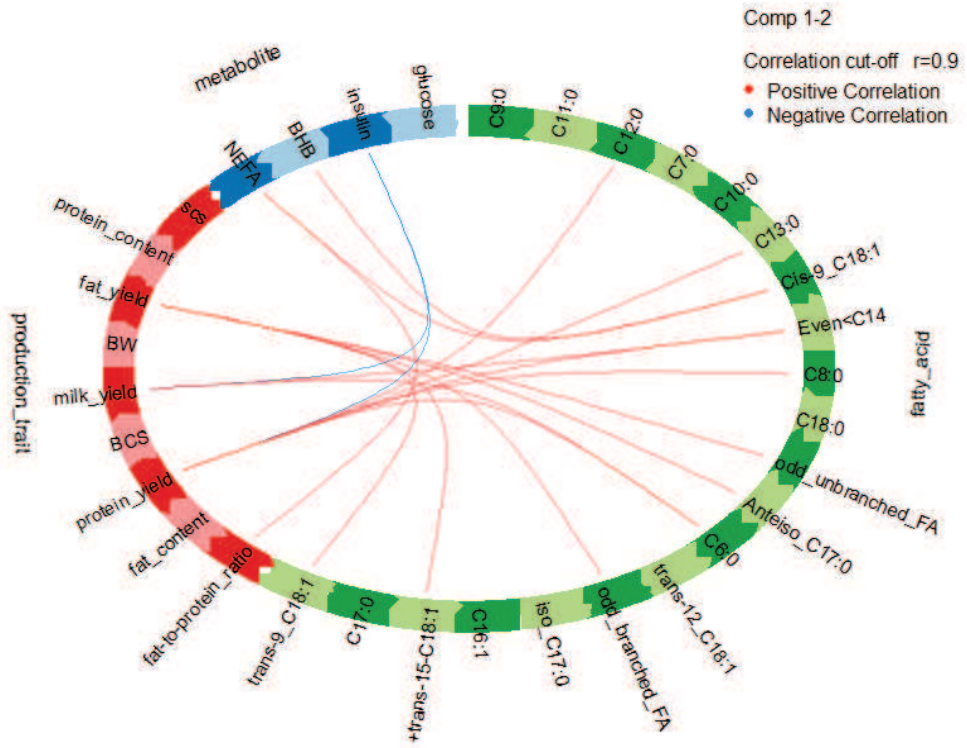


Figure 3. Correlation circle plot after a supervised classification by sparse Partial Least Squares - Discriminant Analysis showing correlations between variables of three blocks of phenotypes (blood metabolite concentrations in blue ; milk fatty acids yields in green ; production traits in red). The analysis was conducted using data from 48 ewes at three time points. Blue lines indicate negative correlation and red lines indicate positive correlations. Intra-block correlations are not presented. Cutoff was fixed at 0.9.

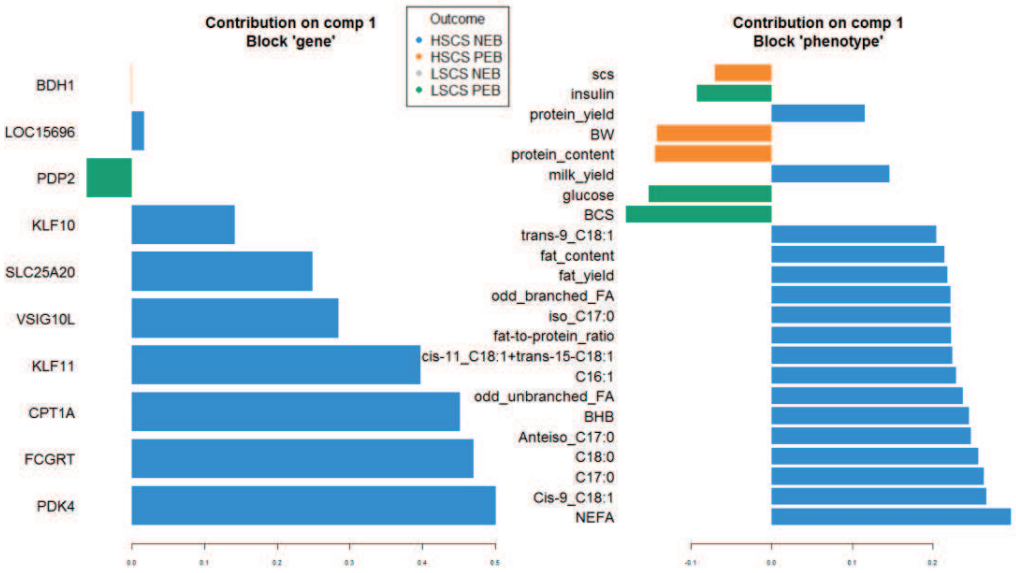


Figure 4. Visualization after a supervised classification by sparse Partial Least Squares - Discriminant Analysis of the phenotypes and the genes which explained the largest part of variance between the four groups on the first PC: High-SCS ewes in Positive Energy Balance (HSCS PEB, n=6, orange), Low-SCS ewes in PEB (LSCS PEB, n=6, green), High-SCS in Negative Energy Balance (HSCS NEB, n=6, blue) and Low-SCS in NEB (LSCS NEB, n=6, grey). The figure shows the variables weight (numerical scale) on the first PC in two blocks of dataset: RNAseq gene expression and a meta-phenotype dataset. Percentage of variance that explains first PC was 0.68 in the meta-phenotype dataset and 0.02 in the gene dataset, respectively. The analysis was displayed with three time points in 24 ewes.

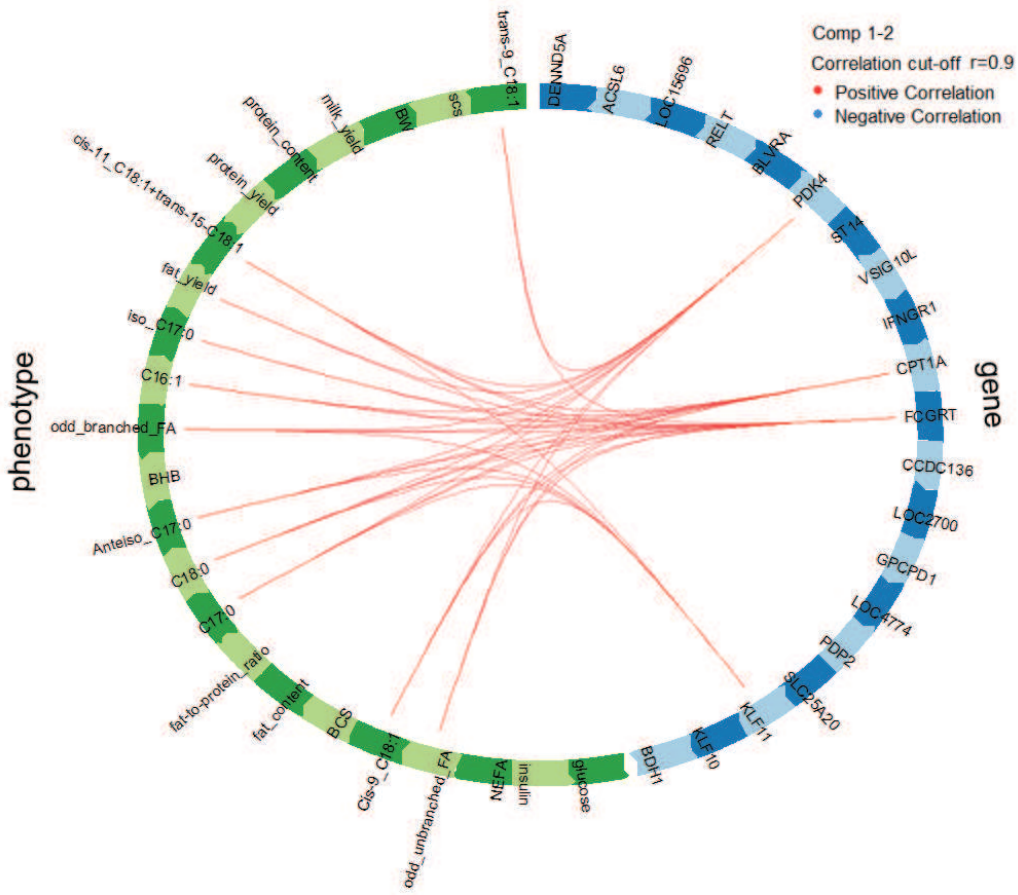


Figure 5. Correlation circle plot after a supervised classification by sparse Partial Least Squares - Discriminant Analysis showing correlations between variables of two blocks (genes in blue ; meta-block of phenotypes in green). The analysis was conducted using data from 24 ewes at three time points. Blue lines indicate negative correlation and red lines indicate positive correlations. Intra-block correlations are not presented. Cutoff was fixed at 0.9.

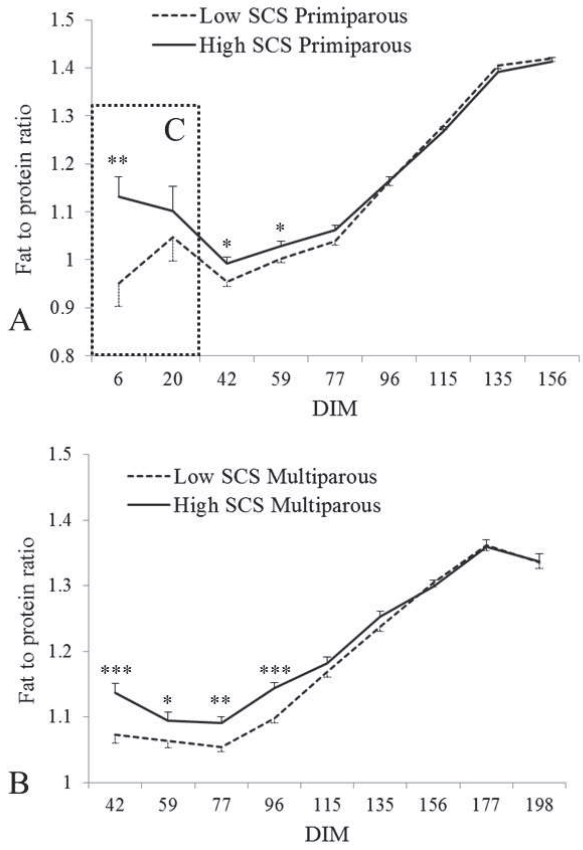


Figure 6. Fat-to-protein ratio (lsmeans ± SE) according to the days in milk (DIM) in Low-SCS (dotted line) and High-SCS (solid line) recorded in field from 2005 to 2016. Mixed model analyses were conducted separately in morning test-day of primiparous (A, n=1025) and multiparous ewes (B, n=715) from 28 to 220 DIM. Two time points in early lactation at 6 and 20 DIM on average were also available for 70 primiparous ewes (C). Significant effect of the genetic line within DIM is shown by stars: * $P < 0.05$ and **$P < 0.01$ *** $P < 0.001$

Les infections intra-mammaires (IMI), sont responsables d'une part prépondérante de la morbidité, de la mortalité ou de la réforme précoce, et de pertes économiques dans les élevages laitiers. Le péri-partum est une période où la fréquence des mammites et des IMI est significativement plus élevée. Parmi les facteurs de risque de ces affections, le déficit énergétique, fréquent au début de la lactation, est souvent évoqué. Cependant, les bases mécanistiques de l'éventuelle relation entre mammite et déficit énergétique sont encore peu connues. L'objectif de ma thèse était ainsi de mieux comprendre et appréhender la relation éventuelle entre le déficit énergétique du début de la lactation et la prédisposition aux mammites en utilisant la brebis laitière comme modèle d'étude. Deux objectifs plus fins ont été définis pour ce travail de thèse :

- Evaluer les effets d'un déficit énergétique sur la réponse à une inflammation mammaire
- Evaluer l'impact de l'interaction éventuelle entre la réponse au déficit énergétique et la prédisposition génétique aux mammites sur la réponse métabolique et inflammatoire

Les résultats obtenus nous ont permis de démontrer une association génétique entre la susceptibilité aux mammites et l'adaptation métabolique à un déficit énergétique. Ils nous ont également permis d'identifier une éventuelle compétition au sein des voies métaboliques entre la réponse au déficit énergétique et la réponse inflammatoire.

Cependant les stratégies expérimentales et méthodologiques utilisées au cours de ces études nécessitent d'être analysées, en évaluant leurs pertinences, les intérêts et les limites à chaque étape pour atteindre nos objectifs. De plus, il est important de discuter nos résultats dans le contexte de l'amélioration génétique des ruminants laitiers, et de proposer un prolongement à ces études qui permettrait de mieux comprendre encore les mécanismes décrits dans ce travail. Les discussions indépendantes de mes différentes études ne seront pas reprises dans ce chapitre.

I. Intérêts et limites de nos stratégies expérimentales et des méthodologies appliquées

I.1. La brebis comme modèle expérimental ?

L'originalité de notre étude est basée sur l'aspect à la fois complexe et intégratif du dessin de notre protocole expérimental (Figure 12). En effet, ce schéma a permis de répondre à plusieurs objectifs qui étaient d'étudier à la fois les effets du fond génétique contrôlant la prédisposition aux mammites, du bilan énergétique, de leur interaction, avant et après une épreuve inflammatoire mammaire sur des paramètres zootechniques, mais aussi métaboliques et transcriptomiques.

Des brebis primipares en début de lactation ont été utilisées pour cette étude expérimentale. D'après la revue de Drackley (1999) « Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? », la période péri-partum qui s'étend de 3 semaines avant à 3 semaines après la parturition est critique pour la santé, la production et la rentabilité des élevages laitiers. C'est en effet pendant cette période qu'a lieu la majorité des troubles de santé comme la rétention des membranes fœtales, les cétoses, les métrites, l'hypocalcémie, les affections de la caillette ou encore les mammites chez les vaches laitières. Le début de la lactation est également marqué par un déficit quasi-systématique chez la vache laitière. Chez la brebis, ces troubles, en particulier ceux de nature métabolique, sont moins fréquents ou intenses, et/ou moins bien étudiés. Il est donc logique de s'interroger sur le choix du modèle animal ovin pour étudier cette période et les troubles qui lui sont associés. Nous avons vu dans l'introduction générale que les brebis, bien que moins affectées par la cétose post-partum sont sujettes à la toxémie de gestation. Cette maladie de fin de gestation touche principalement les brebis avec gestations multiples et reste peu fréquente. Néanmoins, elle demeure une maladie métabolique témoignant de la sensibilité des animaux à ces phénomènes à cette période.

De plus, il est possible de voir dans l'étude réalisée par González-García et al. (2015) sur les brebis Lacaune du troupeau expérimental de La Fage, que les concentrations plasmatiques de BHB et d'AGNE qui permettent de caractériser assez finement le déficit énergétique, sont élevées en début de lactation, en particulier chez les primipares (Figure 13). Chez les bovins, les concentrations plasmatiques d'AGNE et de BHB lors d'un déficit énergétique sont d'environ 1 mmol/L et 0,8 mmol/L, respectivement (Moyes et al., 2009), le seuil retenu pour la cétose suclinique étant de 1,2 ou 1,4 mmol/L selon les auteurs.

Bien que les valeurs mesurées ici soient légèrement inférieures, les valeurs observées chez les brebis en début de lactation, en particulier chez les primipares (0.9 mmol/L pour le NEFA et 0,65 mmol/L pour le BHB chez les primipares) témoignent cependant d'une situation métabolique particulière par rapport au reste de la lactation.

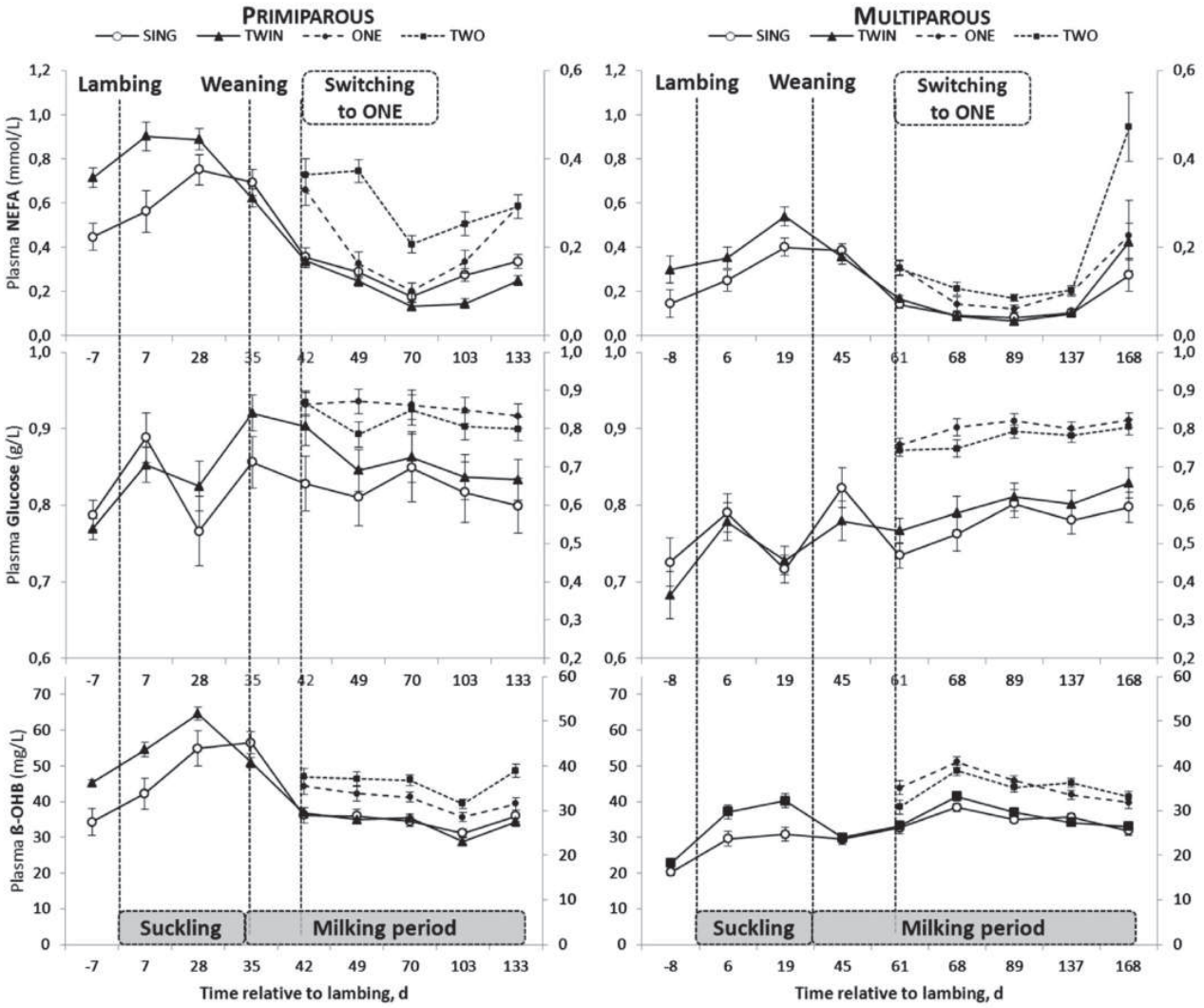


Figure 13 : Etude des métabolites au cours de la lactation chez les brebis Lacaune (González-García et al., 2015)

Au vu de ces observations, nous avons donc conclu que la brebis pourrait servir de modèle expérimental, avec aussi des avantages par rapport à un modèle bovin comme la possibilité de produire un plus grand nombre d'échantillons (grâce à un moindre coût), la facilité d'accès (ferme expérimentale de la Fage), et l'existence d'une sélection divergente sur la prédisposition aux mammites. Toutefois, les résultats obtenus grâce à ce modèle nécessitent bien évidemment d'être vérifiés avant de pouvoir être généralisés à toutes les espèces.

I.2. La période péri-partum ou le milieu de lactation ?

Il est important de remarquer également que l'essai a été réalisé sur des animaux en début de lactation (à environ 2 semaines de la parturition). Comme nous l'avons vu précédemment, la période péri-partum est une période de transition, durant laquelle des mécanismes physiologiques, métaboliques et immunitaires s'ajustent et affectent l'ensemble du fonctionnement de l'organisme. Certaines études de restriction des apports alimentaires dont celles de Perkins et al. (2001) ou Moyes et al. (2009) ont été réalisées en milieu de lactation afin de pouvoir occulter les effets concomitants d'autres facteurs du début de lactation. Cependant, Gross et al. (2011) ont montré que les conséquences métaboliques d'un déficit énergétique correspondant à au moins 30% des besoins individuels en milieu de lactation (DIM=100) étaient plus faibles que celles d'un bilan énergétique négatif naturel en début de lactation. Ces données nous ont donc conforté dans notre objectif d'accroître l'intensité du phénomène de déficit énergétique latent, et probablement des mécanismes qui existent spontanément, afin de mieux comprendre la relation métabolisme/immunité.

I.3. Le choix des brebis et la constitution des groupes expérimentaux en relation avec le bilan énergétique

Durant le protocole expérimental, les bilans énergétiques individuels des brebis ont été calculés à partir de leur production laitière et de leur poids en utilisant les données et les équations de prédiction disponibles dans les tables INRA. La moitié des brebis (soit 12 brebis de chaque lignée) a été affectée au groupe en restriction énergétique (60% de leurs besoins individuels calculés sur une moyenne de trois mesures obtenues durant la phase préliminaire à l'expérience). Comme le montre la figure 2 de l'étude 1, la restriction a permis d'obtenir un bilan énergétique moyen d'environ 60%, soit un niveau qui est similaire à celui constaté lors d'affection métabolique chez la vache laitière à cette même période (Rastani et al., 2001).

Les brebis restreintes avaient été choisies de manière à créer quatre groupes équilibrés sur les critères de la production laitière, de la composition du lait, du poids et de la taille de la portée. Cependant, quelques brebis ont été affectées à ce groupe car leur bilan énergétique était déjà négatif durant la phase préalable, et pour réduire la variabilité intra-groupe, il était exclus qu'elles soient affectées au groupe dont les besoins étaient couverts. Cependant, ce choix, même s'il a permis une meilleure homogénéité des groupes présente cependant plusieurs limites.

En effet, un certain nombre de paramètres, comme la concentration en BHB (Figure 14) ou l'expression de l'enzyme PDK4, qui régule l'utilisation du glucose, étaient, avant le début de la restriction, déjà plus élevées dans les groupes où la restriction énergétique serait appliquée. Les différences observées demeuraient cependant non significatives. Par ailleurs, on ne peut pas exclure que ces différences n'ont pas eu des répercussions sur le comportement métabolique des animaux qui avaient déjà un bilan énergétique négatif avant la restriction.
Nous pensons toutefois, que ce phénomène traduit une prédisposition qui s'est amplifiée à la suite du régime différencié.

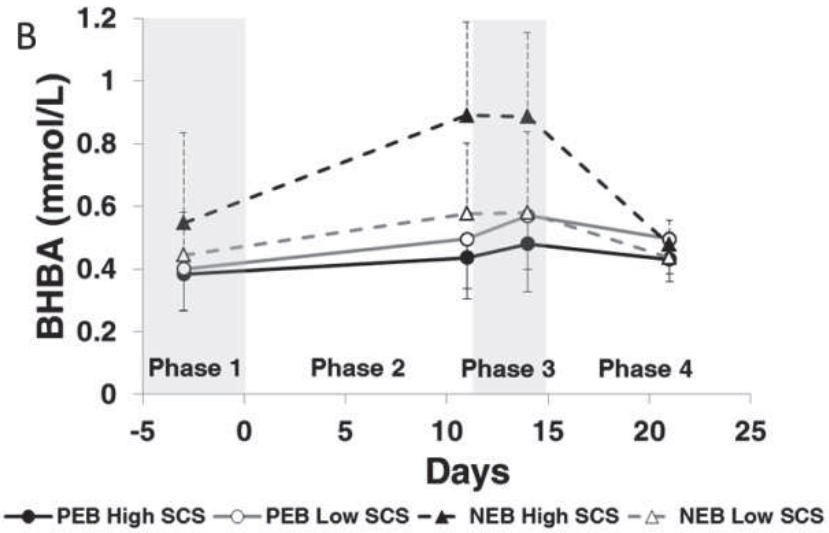


Figure 14 : Concentration plasmatique de BHB chez 12 brebis CCS+ (▲) et 12 brebis CCS- (△) en déficit énergétique, et 12 brebis CCS+ (●) et 12 brebis CCS- (○) contrôles. Le jour 0 correspond au premier jour de la restriction (Bouvier-Muller et al., 2016).

I.4. L'épreuve inflammatoire mammaire

Après 11 jours de régime différencié, une solution stérile de phlogogènes (Pam3CSK4 et MDP) a été injectée dans une hémi-mamelle saine afin de provoquer une inflammation. Une des hypothèses que nous avons cherchée à évaluer par cette approche était l'effet du bilan énergétique négatif, et des métabolites associés, sur la réponse mammaire aux infections. L'infection expérimentale aurait été une stratégie idéale pour pouvoir évaluer de telles différences. Cependant, les infections expérimentales ne peuvent être réalisées que dans des unités dédiées et protégées, difficilement sur de effectifs de plus d'une dizaine d'individus, et il était exclus d'inoculer un germe à des animaux hébergés dans un troupeau partageant avec eux, le logement et les équipements de traite.

Afin de pallier ce problème, un modèle de mammite aspetique a été développé, semblable à celui utilisé chez la vache avec l'injection de lipopolysaccharide (LPS) fréquemment utilisé pour l'étude de la réponse mammaire à l'inflammation. Le LPS est une molécule de la membrane externe des bactéries Gram-négatives, parmi lesquelles *Escherichia Coli* est la bactérie la plus fréquemment isolée en cas de mammites cliniques chez les vaches laitières. Il fait partie des ligands associés aux agents pathogènes (Pathogen-associated molecular patterns ou **PAMP**s) les mieux étudiés. Chez les ovins en revanche, les agents étiologiques responsables de mammites les plus prévalents sont les Staphylocoques ; leur proportion moyenne, parmi les germes isolés en culture cellulaire étant de 80% environ (Ariznabarreta et al., 2002). A l'inverse du modèle utilisant le LPS, peu d'études ont été réalisées dans le but de connaître la réponse spécifique de l'hôte aux PAMPs de germes Gram-positifs et des Staphylocoques en particulier (Rainard et al., 2008). D'après Rainard et Riollet (2006), la reconnaissance des Staphylocoques par les cellules immunitaires est essentiellement médiée par TLR2. Le récepteur intracellulaire NOD2, dont le PAMP muramyldipeptide (MDP) est un ligand connu, entraine également l'activation des TLR (Fournier and Philpott, 2005).

Afin de mieux comprendre la réponse systémique à une inflammation provoquée par des Staphylocoques et son interaction éventuelle avec le bilan énergétique et la lignée génétique, nous avons donc choisi d'utiliser une combinaison de ligands de NOD2 et de TLR2, soit respectivement MDP et Pam3CSK4, un lipopeptide synthétique mimant l'activité des lipoprotéines de ces bactéries.

D'après nos résultats, cette épreuve inflammatoire a bien induit une réponse inflammatoire intense. En effet, la concentration cellulaire du lait a fortement augmenté comme le montre la Figure 6 de l'étude 1. La concentration de leucocytes du sang a également diminué. Les analyses par cytométrie de flux ont révélé par ailleurs que tous les types cellulaires ont augmenté dans le lait (Figure 7 de l'étude 1 montrant les types cellulaires dans l'hémi-mamelle infectée) et diminué dans le sang (Figure 15).

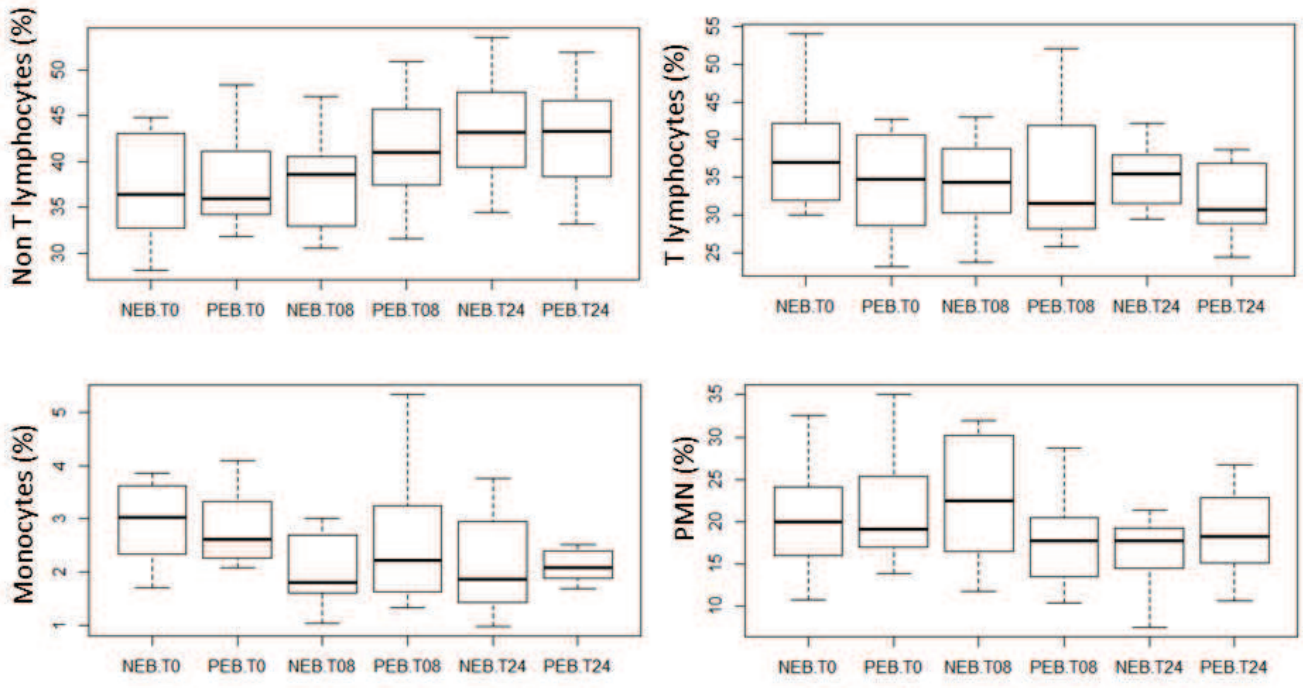


Figure 15 : Résultats de l'analyse par cytométrie en flux des types cellulaires du sang chez les brebis en restriction énergétique (NEB) et les brebis contrôle (PEB) à trois pas de temps, relatifs à l'injection intramammaire (T0).

Il est important de noter que l'injection avait été réalisée dans l'hémi-mamelle dont la CCS était la plus basse pour chaque brebis afin de pouvoir observer le recrutement cellulaire sans effet parasite du statut sanitaire initial de la glande éprouvée.

De plus, l'analyse RNA-seq réalisée sur les cellules du sang total a révélé une intense modification du transcriptome à 8h (3482 gènes différentiels) et 24h (3617 gènes différentiels) après l'injection. Ces gènes représentaient principalement une activation de différentes voies immunitaires confirmant l'efficacité de ce modèle d'inflammation mammaire. En revanche, un certain nombre de gènes indiquait une activation de voies de l'immunité adaptative alors que l'activation cellulaire via TLR2 est réputée pour stimuler plutôt des voies de l'immunité innée, et en particulier le recrutement de macrophages (Underhill et al., 1999). Ces résultats intéressants ne seront pas davantage développés dans cette discussion mais feront l'objet d'un article hors thèse.

Bien qu'apparaissant comme un succès dans la stimulation des voies immunitaires et du recrutement cellulaire du sang vers le lait, notre modèle d'épreuve avec Pam3CSK4/MDP n'a pas révélé d'interaction entre le bilan énergétique et les réponses phénotypique ou transcriptomique. Il est possible que les voies induites par ce modèle ne soient pas celles affectées par le déficit énergétique. Cependant cette hypothèse n'est pas en accord avec l'étude de Moyes (2010) qui a montré une différence d'expression de 12 gènes immunitaires dont TLR2 dans les PMN sanguins entre des vaches Holstein restreintes et contrôles 24h après une infection expérimentale à *E. Coli*. Il est possible que les différences d'expression géniques étaient trop faibles pour être observées, ce qui est en accord avec les faibles variations d'expression observés dans l'expérience de Moyes (2010).

I.5. Le transcriptome sanguin comme support de l'étude des réponses locale et systémique

Un des objectifs de notre étude était de comprendre les conséquences du bilan énergétique, de la lignée génétique, de l'inflammation mammaire et de leurs interactions sur l'efficacité de l'immunité locale.

Dans le contexte particulier de la glande mammaire, la complexité des interactions cellulaires ne peut pas être reproduite à partir d'un simple modèle cellulaire en culture, et c'est pourquoi de nombreuses études utilisent le tissu mammaire intact (Pareek et al., 2005 ; Strandberg et al., 2005 ; Zheng et al., 2006, Lutzow et al., 2008, Swanson et al., 2009 ; Bonnefont et al., 2012). Différentes options sont alors possibles, comme l'utilisation de coupes de parenchymes mammaires ou des biopsies de ce tissu. En raison de la nature alvéolaire et de l'abondance du tissu conjonctif, les coupes de parenchyme mammaires restent peu utilisés car difficiles à mettre en œuvre du point de vue technique. En revanche, les biopsies mammaires sont quelquefois choisies, pour les études du transcriptome bien qu'elles soient éthiquement assez controversées et qu'elles interdisent la répétition des prélèvements et les études en cinétique sur le même animal, à cause de la réaction traumatique et de l'inflammation qu'elles provoquent.

D'autres auteurs ont choisi d'étudier les cellules somatiques du lait (Ollier et al., 2007 ; Cánovas et al., 2010 ; Bonnefont et al., 2011). Cette méthode permet notamment un échantillonnage facile sans contrainte particulière, ni d'effet secondaire sur l'animal. Cependant, après infection, la proportion de neutrophiles dont une majorité de cellules apoptiques augmente fortement dans le lait jusqu'à représenter la presque totalité des cellules présentes. De ce fait, la qualité de l'ARN de ces prélèvements est souvent médiocre.

De plus, ces échantillons ne permettent qu'une analyse très partielle de la réponse de l'hôte à l'infection, car ils contiennent majoritairement un type cellulaire à l'activité transcriptionnelle faible et impliqué dans les mécanismes d'élimination du germe de l'organisme mais qui ne permet pas l'étude des mécanismes de détection de l'agent infectieux et de régulation de la réponse inflammatoire et immunitaire.

Enfin, et c'est l'approche que nous avons choisie, il est possible d'étudier les cellules du sang, considérées globalement (sang total) ou prises séparément après purification comme les cellules mononucléées (Peripheral blood mononuclear cells, PBMC) ou des populations plus spécifiques comme les lymphocytes ou les monocytes. La condition à cette analyse est que l'infection locale ait des répercussions suffisamment marquées pour être détectées dans le sang.

Nous avons donc choisi d'utiliser le sang total pour étudier la réponse systémique, via l'étude des cellules du sang, à deux phénomènes biologiques distincts : le bilan énergétique négatif et l'inflammation mammaire aseptique. Nos résultats ont montré que le transcriptome des cellules du sang total subissait d'importantes modifications, notamment de voies de l'immunité, en réponse à une inflammation mammaire ; nous avons donc validé l'utilisation de cette approche pour l'étude des phénomènes inflammatoires locaux. Cependant, des analyses complémentaires, comme la mesure des concentrations des cytokines ou des chimiokines sont indispensables afin de valider les hypothèses proposées par l'analyse RNAseq. Cette approche représente à l'heure actuelle le meilleur compromis en termes techniques, scientifiques, économiques et éthiques.

I.6. La technique RNAseq

Le RNA-seq est une technique relativement récente également appelée "Whole Transcriptome Shotgun Sequencing". Cette technique permet en effet de couvrir l'intégralité des transcrits et des différents exons qui les composent, ce qui présente un net avantage sur les précédentes techniques de mesure du transcriptome, comme les puces à ADN, également appelées biopuces ou microarrays. Le séquençage de seconde génération (next-generation sequencing) a donc été rapidement utilisée pour les études d'expression génique chez la souris et chez l'homme (Nagalakshmi et al., 2008).

Le principe du RNAseq est le suivant : le nombre de fragments de séquences (on parle de reads) est proportionnel à l'abondance des ARN correspondants dans la cellule. Les reads sont les fragments très courts (environ 100 nucléotides) qui sont séquencés et ensuite assemblés en séquences continues (appelées contigs) grâce à l'alignement des séquences de fragments qui se chevauchent. Les gaps sont des séquences qui ne chevauchent pas et n'appartiennent donc pas à un contig. L'un des inconvénients des NGS est la petite taille des fragments séquencés d'où un nombre élevé de gaps, en particulier pour les régions de faible complexité.

Les informations obtenues par le RNAseq peuvent être divisées en deux catégories :

- Des informations qualitatives (identification de transcripts, d'exons, de sites maturés,…)
- Des informations quantitatives (différence d'expression génique, d'épissage alternatif,...)

Ces deux catégories d'informations sont indissociables. Cependant, les expériences permettant d'obtenir ces informations nécessitent des dessins d'expérience différents, et il serait difficile et onéreux de réaliser une même expérience permettant d'obtenir ces deux types d'informations. L'objectif de notre expérience était principalement de mesurer les différences d'expression génique entre les régimes, les lignées ou l'état inflammatoire de l'animal. Nous avons donc privilégié le nombre de réplicas biologiques (six brebis par groupe et quatre pas de temps) et une profondeur de séquençage suffisante (20 millions de reads par échantillon) pour interpréter correctement les différences statistiques. D'après les travaux réalisés par Schurch et al. (2016), six réplicats est un minimum pour garantir la précision et la robustesse des résultats. Cependant, la qualité du séquençage dépend également du niveau d'expression des potentiels gènes d'intérêt et de la qualité de l'annotation du génome utilisée à l'étape d'alignement des reads (mapping).

Lors du séquençage, il est également possible de choisir entre un séquençage « single-end » (un seul adaptateur est utilisé pour le séquençage) ou « paired-end » (des adaptateurs sont placés de chaque côté du fragment). Les séquençages « single-end » ont pour avantage d'être plus rapides et moins chers. Cependant, les séquençages « paired-end » permettent d'assembler les gènes sur le génome de manière plus précise et exacte. De plus notre séquençage était orienté, c'est-à-dire que des « adaptateurs Y » ont également été ajoutés lors de la construction des librairies afin d'obtenir des molécules asymétriques. Cette méthode permet notamment de conserver le sens originel du brin d'ADN fragmenté.

Le nombre de réplicats utilisés, la profondeur de séquençage choisie ainsi que la construction précise des librairies de chaque échantillon nous ont dont permis d'obtenir un jeu de donnée de bonne qualité pour analyser des différences d'expression géniques.

❖ Le choix des traitements bioinformatiques

L'analyse de données brutes obtenues après séquençage sur une plateforme requiert une grande puissance de calcul et leur exploitation nécessite le développement ou l'utilisation de méthodes bioinformatiques qui ne sont pas aujourd'hui standardisées. Beaucoup de paramètres sont en constante évolution pour limiter les biais qui sont dus à d'autres effets que l'effet biologique à mesurer : réglages au niveau de la manipulation, des traitements bioinformatiques et des prétraitements statistiques. La figure 16 montre les traitements bioinformatiques que nous avons utilisés pour nos données RNAseq.

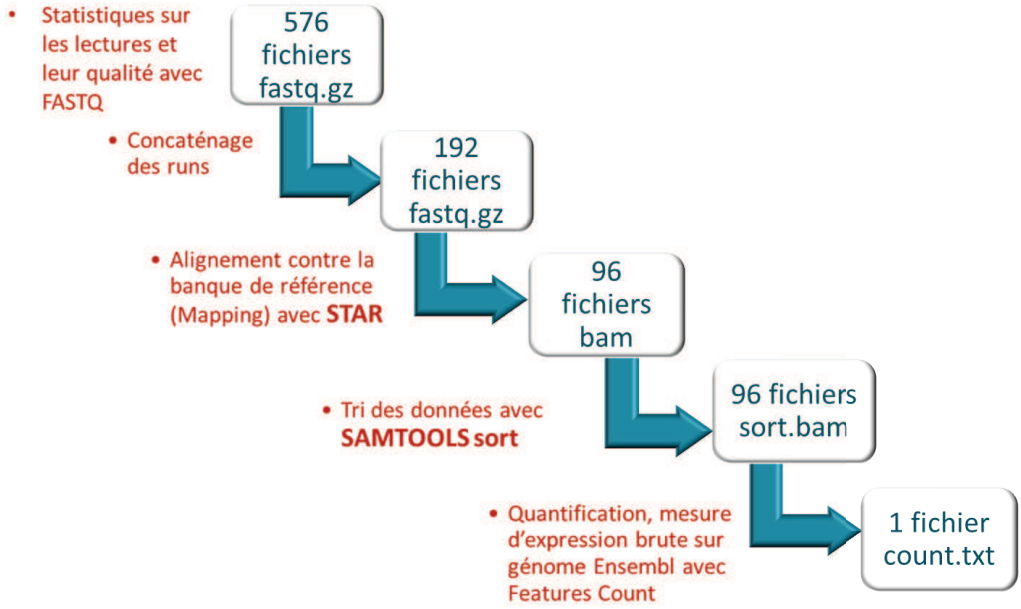


Figure 16 : Chaine de traitements bioinformatiques utilisés

Dans leur étude, Li et al. (2016) ont comparé trois protocoles de traitement des données (work-flows) différents incluant le contrôle qualité, le mapping, la quantification et l'analyse différentielle sur des données d'animaux d'espèces de rente. Parmi les logiciels utilisés pour le mapping se trouvaient deux logiciels fréquemment utilisés STAR et Tophat 2 ainsi que Tuxedo. D'après leur étude, il y avait peu de différences de mapping entre STAR et Tophat2 (nombre de read alignés, jonctions,..).

L'avantage de STAR réside davantage dans sa rapidité alors que Tophat2 demande moins de puissance de calcul. L'utilisation de STAR a donc été préférée dans notre étude grâce à l'importante puissance de calcul auquel nous avions accès.
De même, de nombreux programmes existent pour déterminer l'abondance des transcrits pour chaque région génomique, en particulier Cufflink (Trapnell et al., 2010), HTSeq-counts (Anders et al., 2015) ou FeatureCounts (Liao et al., 2014). FeatureCounts a été choisi en raison de sa rapidité et de sa moindre exigence en puissance de calcul.

- Le choix des traitements statistiques

Avec l'environnement de calcul statistique R, il existe différents packages permettant l'analyse statistique des données de RNA-seq. Les deux principaux packages utilisés pour identifier des listes de gènes différentiellement exprimés entre condition(s) sont edgeR et DESeq2. Ces deux packages diffèrent notamment par leur méthode de normalisation. En effet, edgeR utilise une normalisation grâce à la méthode Trimmed Mean of M-values (TMM (Robinson and Oshlack, 2010), alors que DESeq utilise une méthode de « Relative Log Expression » développée par (Anders and Huber, 2010). Les deux méthodes se basent sur l'hypothèse selon laquelle la plupart des gènes ne sont pas différemment exprimés et sont particulièrement appréciées pour corriger le biais induit par des tailles de librairie très différentes au sein d'un même jeu de données (Dillies et al., 2013).
Les packages edgeR et DESeq2 utilisent ensuite tous deux une loi binomiale négative afin de modéliser la variance technique et biologique du jeu de données. Cependant, les deux packages diffèrent par leur méthode d'estimation des paramètres de dispersion. En effet, les données RNA-seq ont généralement peu de réplicats biologiques et le paramètre de dispersion est de ce fait mal estimé. Les deux méthodes utilisent donc des techniques de partage d'information entre les gènes afin d'estimer le paramètre de dispersion de chaque gène. Le package DESeq2 modélise ainsi la tendance moyenne-variance afin d'estimer le paramètre de dispersion (Love et al., 2014), alors que le package edgeR utilise un compromis entre une dispersion commune à tous les gènes et une dispersion spécifique à chaque gène (Robinson and Oshlack, 2010).
D'après Schurch et al. (2016), DESeq2 et edgeR sont les outils les plus performants pour analyser les données provenant d'un protocole expérimental comportant moins de 12 réplicats biologiques. Pour plus de 12 réplicats biologiques, la minimisation des faux positifs devient moins importante et DEseq2 surpasse alors les autres outils d'analyses de données RNAseq.

Les analyses que nous avons réalisées lors de notre deuxième étude comprenaient au moins 12 réplicats biologiques pour les deux analyses, c'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser DESeq2 comme outil d'analyses statistiques pour nos données.

Notre jeu de donnée présentait également des répétitions dans le temps au sein des mêmes individus. La modélisation de ce type de données répétées fait habituellement recours à un modèle mixte où l'effet de l'animal est aléatoire. Il est important de noter que nous avons cruellement manqué d'un outil statistique abouti nous permettant de modéliser cet effet lors de nos analyses. Cependant, nous avons testé un modèle linaire mixte (package nlme de R) sans prendre en compte la distribution non normale des données. Ces résultats préliminaires ont conforté les résultats obtenus avec DESeq2, en particulier l'ordre des gènes selon leur pvalue.

- La correction de tests multiples

Enfin, une correction de tests multiples a été systématiquement appliquée lors des analyses de données RNAseq. En effet, des tests indépendants sont réalisés sur plusieurs milliers de gènes simultanément. Ainsi, sur 10 000 gènes, un test multiple avec un seuil de p-value à 5% entrainerait statistiquement 500 erreurs de premier type (gènes considérés alors comme différentiels alors qu'ils ne le sont pas). La valeur p (p-value) classique n'est donc pas adaptée et il est nécessaire d'utiliser une valeur ajustée adaptée aux tests multiples. Il existe différentes méthodes d'ajustement de la p-value, notamment :

- la procédure de Bonferroni qui consiste à contrôler le Family Wise Error Test (FWER), c'est à dire la probabilité d'avoir au moins un faux positif.
- la procédure de Benjamini-Hochberg (BH, Hochberg et Benjamini 1990), qui consiste à contrôler le False Discovery Rate (FDR), c'est à dire la proportion de faux positifs dans les gènes déclarés différentiellement exprimés.

La méthode BH est la moins drastique et la plus répandue dans les analyses RNAseq ; c'est pourquoi nous l'avons utilisée lors de nos analyses. Celles-ci me poussent toutefois à mentionner que la correction BH augmente fortement le nombre de faux-négatifs. En effet, comme le montre les résultats complémentaires de l'étude 2, un certain nombre de gènes étaient considérés comme non significatifs à un pas de temps (H0, H8 ou H24) après correction BH, alors qu'une analyse globale sur trois dates a permis de les identifier.

Le principe de la correction réside dans ce calcul :

$$padj = pval\frac{n}{r}$$

avec r, le rang du gène (par rapport à sa p-value), et n le nombre de gènes totaux.

Notre jeu de données comportait 25 197 gènes, chaque p-value était donc multipliée par ce nombre, et divisée par son rang. Celui-ci joue donc de manière importante : une p-val de 0,001 correspond à une padj de 0,25 si le gène se trouve au 100ième rang et à une padj de 0,05 s'il se trouve au 500ième rang. D'un point de vue personnel, la correction de tests multiples BH ne m'a donc pas paru toujours adaptée à l'analyse des données.

I.7. L'intégration de données phénotypiques et transcriptomiques

L'intégration des données omiques est un outil essentiel comme le montre le nombre de revues scientifiques couvrant ce sujet ces dix dernières années (Reif et al., 2004 ; Hamid et al., 2009 ; Hawkins et al., 2010 ; Holzinger and Ritchie, 2012). Bien que le terme utilisé soit répandu dans la littérature, on associe à cette dénomination de nombreuses acceptions statistiques ou biologiques.

On peut en réalité définir l'intégration de données omiques comme étant la combinaison statistique de données permettant une modélisation plus compréhensible d'un système biologique, d'un caractère complexe ou d'un phénotype, mais également permettant une identification de mécanismes, gènes, protéines, métabolites qui joueraient des rôles clés dans le système étudié.

MixOmics est un package de R permettant l'utilisation de méthodes multivariées innovantes pour l'exploration et l'intégration de données omiques et développé en partie à Toulouse par Kim-Anh Lê Cao et Sébastien Desjean. L'approche se base non plus sur l'identification de gènes différentiellement exprimés entre condition(s) mais sur des approches de classification. Le package MixOmics était donc particulièrement adapté pour étudier les relations entre nos différents jeux de données : phénotypes détaillés et données de transcriptome RNAseq. Les résultats obtenus et les nombreuses représentations graphiques implémentées dans mixOmics ont notamment permis d'appréhender une compréhension globale d'un ensemble de mécanismes dans un système donné.

II. Réflexions sur la relation entre la prédisposition aux mammites et le déficit énergétique

II.1. Absence d'effet direct du déficit énergétique sur la réponse inflammatoire

L'analyse phénotypique a mis en évidence une réponse des brebis au déficit énergétique similaire à celle décrite chez les bovins : la production laitière, le poids, la NEC et la concentration du glucose plasmatique ont diminué alors que le rapport TB/TP, la quantité des AG à longues chaînes dans le lait et les concentrations plasmatiques en AGNE et BOH ont augmentés.

La diminution des apports en énergie par la ration a eu pour conséquence une mobilisation intense des tissus adipeux. Cette source endogène d'énergie permet de répondre partiellement à la forte demande, notamment à la consommation d'énergie pour la production laitière. Les acides gras ont été produits après hydrolyse des triacylglycérols contenus dans les adipocytes du tissu adipeux, et libérés dans le sang. Une partie d'entre eux sont ensuite captés par le foie comme source d'acyl-CoA pour la production d'acétyl-CoA par β-oxydation. Une partie de l'acétyl-CoA, surtout s'il est en excès et n'est pas oxydé par la cycle de Krebs défaillant, conduit à la synthèse des corps cétoniques (Dann et al., 2006 ; Goff, 2006). L'augmentation des AG sanguins, dont une partie est captée par la mamelle, entraine l'augmentation de la matière grasse du lait et du rapport TB/TP.

Alors que cette situation métabolique est supposée induire des modifications de la réponse inflammatoire, les analyses mises en œuvre ne nous ont pas permis d'établir de différence de la réponse entre les brebis de différent statut énergétique. En effet, aucune différence de recrutement cellulaire dans le lait n'a été observée entre les deux régimes en réponse à l'épreuve inflammatoire mammaire. La proportion des types leucocytaires dans le sang et dans le lait était sensiblement la même entre les deux régimes avant ou après l'épreuve. Ces observations sont cependant concordantes avec celles qui avaient été faites dans l'étude de Moyes et al. (2009). Les auteurs avaient examiné les effets d'une restriction énergétique sur la réponse immunitaire d'une infection mammaire expérimentale avec *Streptococcus uberis* chez 12 vaches de race Holstein. Leurs travaux montrent en effet que la restriction énergétique était sans effet sur le recrutement cellulaire dans le lait, et de manière générale n'affectait que faiblement la réponse immunitaire, avec notamment une légère diminution des capacités phagocytaires des neutrophiles chez les vaches restreintes.

Nos travaux n'ont pas permis d'établir une différence d'expression génique des leucocytes sanguins en réponse à l'inflammation entre les deux régimes. Dans la même expérience que celle décrite précédemment, Moyes et al. (2010) avaient établi une modification de l'expression de 12 gènes (mesurée par qPCR) impliqués dans des fonctions immunitaires des neutrophiles sanguins 24h post-inoculation. Sept gènes (ALOX5AP, CPNE3, IL1R2, IL6, TLR2, TLR4, THY1) étaient en effet plus fortement exprimés et cinq gènes (HLA-DRA, HLA-A, IRAK1, SOD1, TNF) moins exprimés chez les vaches restreintes. Cependant les différences d'expression observées étaient relativement faibles. Notons toutefois que la qPCR permet de détecter des différences d'expression de moindre intensité que le RNA-seq, cela pouvant expliquer le petit nombre de différences d'expression que nous avons détectées. Nous ne pouvons pas exclure non plus que seule une fraction ou un type cellulaire particulier est été affecté par la restriction ; dans une analyse d'expression globale de tous les leucocytes sanguins, une telle différence spécifique pourrait ne pas être mise en évidence car diluée dans la réponse de l'ensemble des types cellulaires.

Ces observations nous poussent donc à suggérer que le déficit énergétique n'a qu'un effet direct faible sur les fonctions des leucocytes sanguins.

II.2. Des relations immunité/métabolisme incontestables

II.2.1. L'immunité et le métabolisme lipidique

Nos travaux ont cependant montré que l'inflammation avait des effets sur le métabolisme des cellules sanguines, et en particulier sur le métabolisme lipidique. En effet, notre étude transcriptomique indique que le facteur de transcription SREBF1 pourrait réguler un certain nombre de voies du métabolisme lipidique, telles que l'augmentation de la synthèse d'acides gras ou de celle du cholestérol en réponse à l'inflammation. Ces résultats étaient en accord avec la méta-analyse de Genini et al. (2011) sur 6 études indépendantes qui avaient montré l'importance des signaux métaboliques dans la réponse précoce de la réponse immunitaire, dont la modulation pourrait être opérée par quelques gènes dont SREBF1. Ces mécanismes métaboliques pourraient notamment jouer un rôle important dans la prolifération cellulaire (Kidani et al., 2013).

De plus, l'étude de Im et al. (2011) avait montré que la protéine SREBP-1a permettait l'activation de gènes impliqués dans la lipogenèse mais également du gène codant pour le Nlrp1a qui est un composant de l'inflammasome, un complexe protéique indispensable à la production d'IL-1β, une cytokine pro-inflammatoire majeure (figure 17).

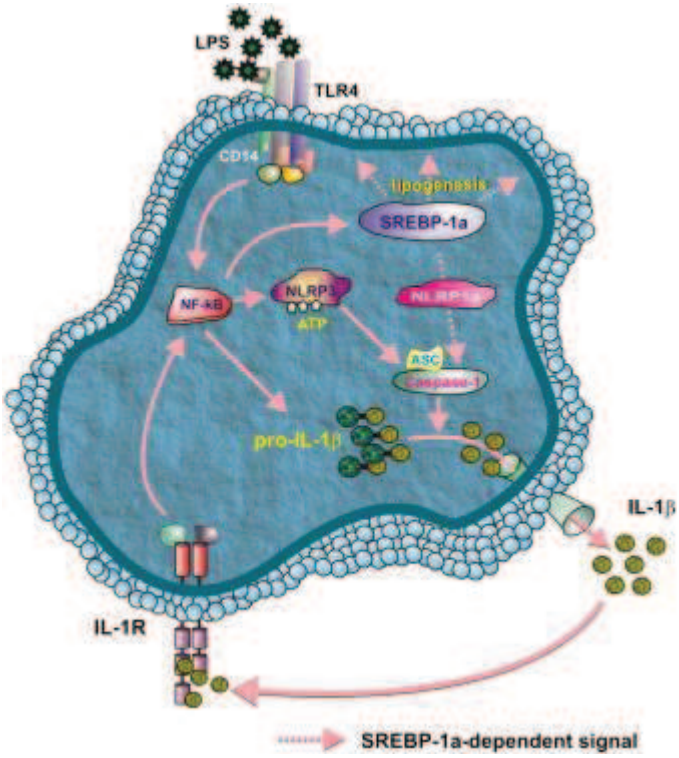


Figure 17 : Schéma bilan du rôle de SREBP dans la lipogenèse et l'inflammation (d'après Im et al., 2011)

De nombreuses études avaient déjà révélé le lien entre métabolisme et immunité comme en témoignent les revues de Castrillo and Tontonoz (2004), Varga and Nagy (2008), et Bensinger and Tontonoz (2008). Cependant, ce sont le facteur de transcription **PPARγ** (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) et le récepteur nucléaire **LXRs** (liver X receptors) qui sont souvent désignés comme éléments pivots entre métabolisme lipidique et inflammation. Ils permettraient notamment d'activer l'expression de gènes essentiels de l'activité des macrophages, et d'augmenter par exemple la capacité phagocytaire et la présentation d'antigènes par les cellules dendritiques.

L'ensemble de ces résultats et des études précédemment menées corroborent donc l'importance des relations entre métabolisme lipidique et immunité.

II.2.2. Le glucose : un nutriment essentiel de la cellule immunitaire

Notre étude a également suggéré le rôle clé du glucose comme nutriment principal de la cellule immunitaire au cours de la réponse inflammatoire. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Frauwirth et al. (2002) qui ont montré l'utilisation du glucose par les lymphocytes T augmentait, ainsi que la glycolyse, durant l'activation cellulaire et la stimulation par le co-récepteur CD28 (figure 18).

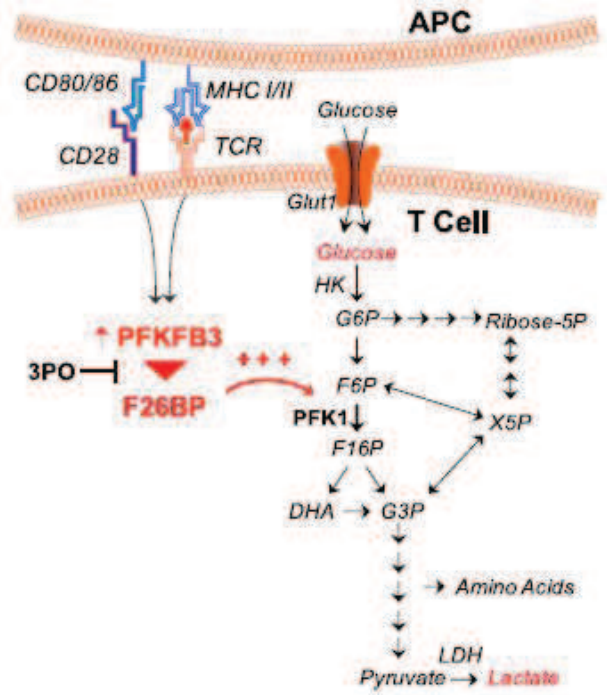


Figure 18 : Schéma-Bilan montrant le contrôle de CD28 sur l'utilisation de glucose dans les lymphocytes T (Telang et al., 2012)

Notre étude a également montré l'augmentation de l'expression de transporteurs du glucose au cours de la réponse inflammatoire, de manière similaire aux résultats d'O'Boyle et al. (2012) qui avaient montré qu'une stimulation de LPS augmentait l'expression de certains transporteurs du glucose (GLUT3 et GLUT4) et que l'expression de tous les isoformes de ces transporteurs de glucose était corrélée positivement à la production de **TNFα** (tumor necrosis factor-α).

Ces données montrent donc l'importance de la concentration en glucose plasmatique sur la réponse inflammatoire. Ils suggèrent aussi qu'un processus inflammatoire systémique ou local est à l'origine d'une utilisation exagérée du glucose avec des conséquences majeures sur l'homéostasie de ce nutriment. Récemment, des travaux ont cherché à évaluer le coût métabolique de la réponse à une épreuve métabolique. Les auteurs ont évalué à plus d'un kilogramme l'augmentation de la quantité de glucose consommée en 12 heures en réponse à une épreuve inflammatoire systémique chez la vache (Kvidera, 2017). Une évaluation comparable chez les brebis des deux lignées serait très informative pour préciser les mécanismes du métabolisme glucosique dans cette espèce et ces lignées.

D'après l'étude 2 présentée dans ce manuscrit, plusieurs voies métaboliques modifiées en réponse à l'inflammation étaient activées de manière opposée en réponse au déficit énergétique, ce qui suggérait une éventuelle compétition entre les réponses aux deux types de stress. Cependant, comme indiqué ci-dessus, la restriction énergétique ne modifiait pas directement le profil immunitaire en réponse à l'inflammation, malgré cette compétition.

D'un point de vue personnel, je pense que ces résultats éclairent un peu mieux la compréhension des mécanismes moléculaires fondamentaux mis en jeu lors d'un stress inflammatoire, mais ne suffisent pas, à eux seuls, à expliquer l'augmentation de la sensibilité des animaux en déficit énergétique aux infections mammaires comme cela a été décrit par ailleurs.

II.3. Existence d'une interaction entre la prédisposition génétique aux infections mammaires et l'adaptation métabolique à un déficit énergétique

Le résultat le plus marquant de cette thèse est la mise en évidence d'une différence d'adaptation du métabolisme face à la réduction des apports en énergie entre les lignées génétiques divergentes sur le score cellulaire du lait. En effet, notre première et notre troisième étude ont permis de montrer une réponse exacerbée des brebis CCS+ à la restriction énergétique par rapport aux brebis CCS-.
Le schéma bilan de la figure 19 montre l'ensemble des processus biologiques dont la variation est amplifiée chez les brebis CCS+ en réponse à la restriction énergétique, comme l'indique l'étude des caractères phénotypiques et des données transcriptomiques des leucocytes du sang.

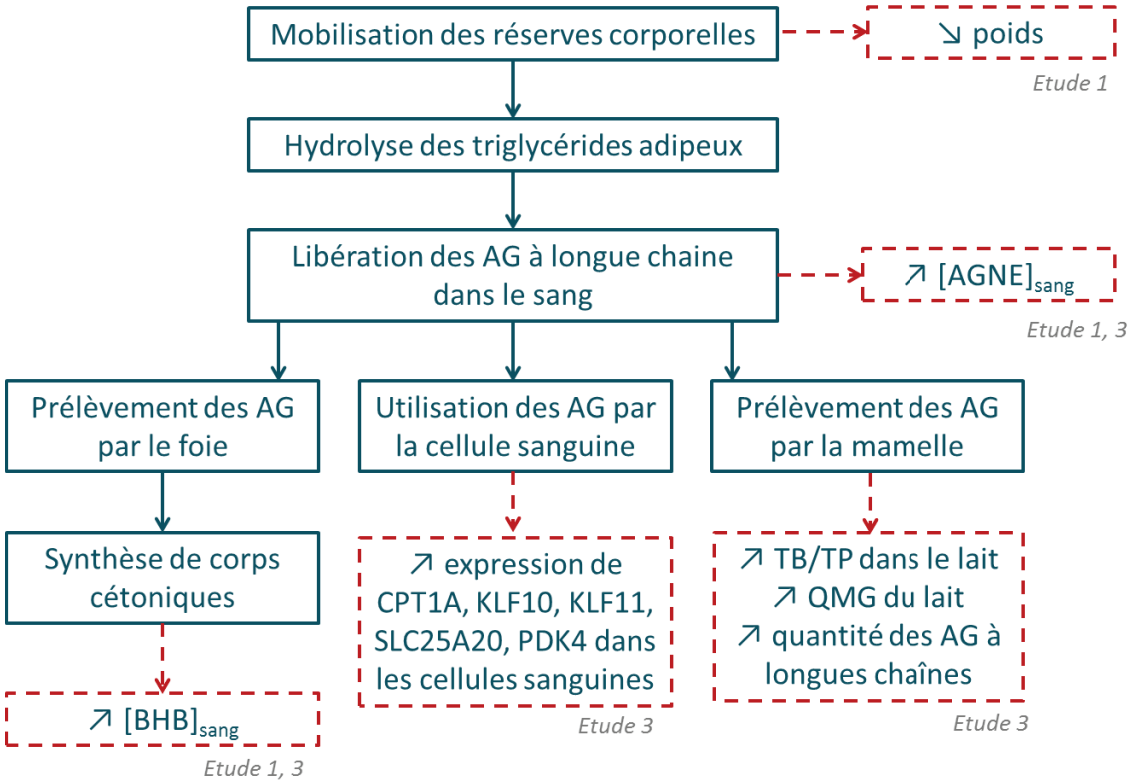


Figure 19 : Schéma-Bilan des processus biologiques (en bleu) exacerbés chez les brebis CCS+ en réponse à la restriction énergétique et mis en évidence par l'analyse des caractères phénotypiques et des données du transcriptome sanguin (en rouge)

L'étude 3 a permis de révéler la forte corrélation entre le rapport TB/TP et d'autres phénotypes qui caractérisent le bilan énergétique de l'animal, comme la concentration sanguine de BHB et d'AGNE ou la quantité d'acides gras à longues chaînes dans le lait. De manière similaire, Grieve et al. (1986) ont montré que l'estimation du bilan énergétique telle que proposée dans leur étude expliquait en moyenne 21% des variations du rapport TB/TP. Les auteurs ont également montré que la prise en compte du rapport TB/TP permettait d'augmenter les coefficients de détermination du bilan énergétique de 19 à 52%. L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que le rapport TB/TP est un bon indicateur et un meilleur prédicteur du statut énergétique que ses composantes.

C'est pourquoi, nous avons cherché à étendre ce constat à des données collectées en élevage sur un plus grand nombre d'animaux. Les données des taux de matière utile du lait, et de ce fait le rapport TB/TP, étaient disponible pour 16 412 contrôles laitiers (soit 1025 brebis entre les années 2005 et 2016) des lignées CCS+/CCS- présentes sur le site expérimental de la Fage. Nous avons donc décidé d'utiliser cette information pour évaluer indirectement le statut énergétique en début de lactation chez ces animaux.

Nous avons constaté que le rapport TB/TP était significativement plus élevé chez les brebis CCS+ en début de lactation que chez les brebis CCS-. Alors que ces brebis sont conduites sans distinction, cette observation renforce l'hypothèse que les brebis des deux lignées se comportent différemment du point de vue métabolique en début de lactation, et que les observations qui ont été faites en réponse à la restriction existent de façon latente à cette période.

II.3.1. Hypothèses expliquant une prédisposition au déficit énergétique chez les brebis génétiquement prédisposées aux mammites

A la lumière de ces résultats, plusieurs hypothèses ont pu être émises :

- Les besoins en énergie sont plus grands chez les brebis génétiquement prédisposées aux mammites.

Le déficit énergétique pourrait spontanément être plus marqué et plus fréquent chez les brebis CCS+ à cause d'une production laitière plus élevée. Cette hypothèse est en accord avec les données présentées à la figure 20 montrant les corrélations entre les caractères de production avant restriction et les concentrations de BHB et d'AGNE pendant la phase de restriction énergétique. Notamment, on peut observer une corrélation assez forte (0.84) entre la production laitière (milk.yield) et la concentration du BHB pendant la période de la restriction (BHB2). Cette figure suggère donc que les brebis qui produisaient le plus de lait avant la restriction sont celles qui ont mobilisé le plus intensément les réserves pendant la durée de la restriction énergétique.

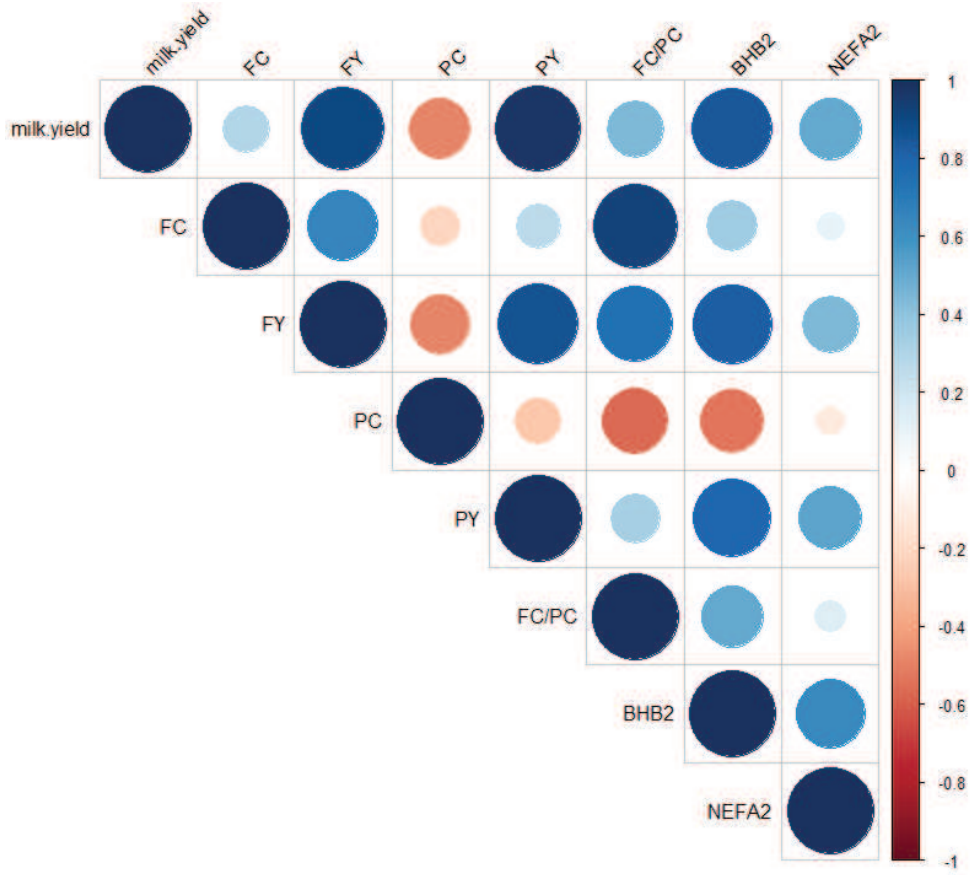


Figure 20 : Heatmap montrant les corrélations entre caractères de production avant restriction avec les concentrations en AGNE (NEFA) et BHB pendant la phase de restriction énergétique

Cependant, plusieurs éléments sont en défaveur de cette hypothèse et indiquent qu'elle ne peut pas suffire à expliquer la totalité du phénomène.

La première raison est d'ordre génétique au moment de la constitution des lignées génétiques. Etant donné l'existence d'une corrélation génétique inverse entre production laitière et fréquence/intensité du développement des mammites chroniques évaluées sur la base des SCS, les béliers qui ont été utilisés pour la procréation des brebis CCS+/CCS- avaient des index estimés (EBV, estimated breeding values) pour la production laitière très proches, afin d'éviter des effets concomitants d'une sélection indirecte sur la production laitière (Rupp et al., 2009). Les données de production laitière collectées pendant plus de 10 ans dans les lignées génétiques sont conformes avec cette volonté, et n'indiquent pas de biais de production majeur entre les lignées génétiques.

Etant donné l'absence de mesure de la production laitière au cours du premier mois de lactation, nous avons évalué la production de façon indirecte par la mesure du gain de poids vif des agneaux. Aucune différence de poids au sevrage n'a été mise en évidence entre les agneaux issus des brebis CCS+ versus CCS-, indiquant que la production de lait qui permet la croissance des agneaux, n'est probablement pas différente entre les lignées.

En outre, le modèle qui a été utilisé pour l'analyse de l'effet de la lignée génétique sur le rapport TB/TP à l'échelle du troupeau prenait en compte la production laitière et toutes les interactions avec les autres variables. Malgré ces précautions, l'effet de la lignée est significatif pour la différence du rapport TB/TP. Il est donc peu probable que la production laitière, légèrement différente entre lignées dans cet essai (48 brebis), puisse expliquer à elle seule, l'augmentation de la sensibilité des brebis CCS+ au déficit énergétique dans son ensemble.

Le bilan énergétique des ruminants laitiers est évalué principalement à partir des caractéristiques de la production laitière (volume, composition) en comparaison de la ration ingérée. Ces informations-là étant connues et mesurée dans notre essai, il n'est cependant pas exclus que les brebis CCS+ aient d'autres sources de dépenses énergétiques qui ne sont pas prises en compte dans le calcul. Comme nous l'avons vu précédemment, la réponse inflammatoire est consommatrice d'une grande quantité de glucose. La différence de sensibilité aux infections mammaires entre les deux lignées, comme cause du développement d'une inflammation mammaire chronique - la fréquence des abcès mammaires est significativement différente entre les lignées - pourrait être à l'origine d'une différence des besoins en énergie. En effet, certaines voies de la réponse immunitaire, notamment des voies de l'immunité adaptative sont activées chez les brebis CCS+ en dehors de l'inflammation induite expérimentalement (résultats non présentés dans ce document, mais qui font l'objet d'un article en préparation). Une activation chronique des réponses immunitaire et/ou inflammatoire pourrait expliquer un besoin énergétique plus grand et une prédisposition à des complications métaboliques plus intense lorsque le déficit énergétique s'accroit.

Cette hypothèse est cohérente avec nos précédentes observations : le glucose semble être le nutriment préférentiel pour les leucocytes durant la réponse à une inflammation. D'autre part, la concentration en glucose sanguin était légèrement plus faible chez les CCS+ avant restriction énergétique, ce qui corrobore cette hypothèse. Cette assomption pourrait également expliquer la propension des brebis CCS+ à mobiliser leurs réserves corporelles et produire une plus grande quantité de corps cétoniques à cause d'une plus faible disponibilité du glucose.

Afin de pouvoir confirmer ou informer cette hypothèse, il serait nécessaire de collecter des échantillons sanguins à plus grande échelle, afin de déterminer si la concentration du glucose plasmatique est inférieure chez les brebis CCS+ en début de lactation. Cette information connue, il serait alors nécessaire d'établir si cette différence serait due à une utilisation accrue ou un défaut de la synthèse du glucose chez les brebis CCS+.

Cette observation nous amène à formuler une deuxième hypothèse :

- Les brebis CCS+ ont un métabolisme basal différent ou une efficacité du métabolisme basal moindre liée à une activité mitochondriale différente

A ce stade, on ne peut pas exclure que les brebis CCS+ aient un métabolisme basal différent. Les brebis CCS+ pourraient avoir un métabolisme hépatique différent avec une moindre efficacité de la néoglucogénèse par exemple. Nous avons vu précédemment qu'immunité et métabolisme étaient étroitement liés. Il est possible qu'une sélection basée sur l'immunité anti-infectieuse ait révélée l'existence de certains génotypes métaboliques particuliers. Il pourrait donc être utile de confirmer une telle association génétique par l'estimation des corrélations génétiques entre SCS et le rapport TB/TP. Une telle association a d'ailleurs été rapportée chez les bovins (de 0,09 à 0,20 en début de lactation, (Negussie et al., 2013). Par ailleurs, il pourrait donc être intéressant de comparer les loci ou QTLs (quantitative trait loci), voire les gènes associés au SCS à ceux associés au rapport TB/TP ou aux valeurs du BHB en début de lactation par exemple. L'identification d'un QTL commun, expliqué par un même gène, permettrait d'identifier l'éventuel mécanisme impliqué dans un phénomène. D'un point de vue pratique, il serait probablement plus aisé de travailler sur les loci génétiques associés au rapport TB/TP car les données du contrôle laitier pourraient être utilisées alors que des prélèvements sanguins supplémentaires sont nécessaires pour utiliser le BHB comme phénotype.

Une autre piste serait la comparaison du transcriptome des cellules hépatiques de brebis CCS+ et CCS- à partir de biopsies réalisées en début et en milieu de lactation, afin de déterminer si le métabolisme des brebis CCS+ est différent de manière constitutive, ou bien seulement en début de lactation. S'il s'avère que le métabolisme hépatocytaire est différent de manière constitutive, quelle que soit la période de prélèvement, le déficit énergétique observé en début de lactation serait alors une conséquence de l'incapacité de ces animaux à gérer l'augmentation des besoins énergétiques de cette période, et à une forme d'emballement des processus métaboliques.

II.3.2. Le rapport TB/TP, un nouvel outil de sélection ?

Notre étude suggère que la moindre prédisposition aux mammites obtenue après sélection génétique sur le SCS contribue à diminuer la sensibilité des brebis à la restriction énergétique en début de lactation, notamment au développement de la cétose subclinique. Cette possibilité d'association génétique entre des paramètres liés aux infections mammaires et aux mammites et à des paramètres liés à une affection métabolique sont en accord avec ceux de Koeck et al. (2014). Les auteurs ont montré que le BHB du lait était génétiquement corrélé au SCS en début de lactation (0,19 pour la période de 5–20 jours en lait, et 0,11 pour la période de 21–40 jours en lait). De manière similaire, Zwald et al. (2004) avaient estimé que la corrélation génétique entre cétoses et mammites dans 646 troupeaux (environ 161 222 vaches) était modérée (0,17) mais significative. Ces informations sont cohérentes et renforcent un peu plus l'existence du lien mis en évidence par nos travaux.

Certains pays ont déjà envisagé utiliser une sélection sur critère de la concentration du BHB dans le lait afin de diminuer la fréquence de la cétose subclinique et les conséquences négatives qu'elle a sur le bon déroulement du début de la lactation. Une étude canadienne récente (Koeck et al., 2016) a notamment montré que le BHB du lait était un caractère plus héritable que la cétose, et qu'il pourrait donc être utilisé pour sélectionner des animaux plus résistants à la cétose. Il pourrait être intéressant d'étudier les conséquences d'une telle sélection sur des caractères liés à la santé.

Enfin, Negussie et al., (2013) ont étudié les corrélations génétiques du rapport TB/TP avec la production laitière, la fertilité et la santé de la mamelle chez les vaches Red Norvegian. Ils ont notamment montré que le rapport TB/TP était un caractère héritable (h^2 = 0,14 à 0,25 pour la première lactation) ; disponible à grande échelle, il pourrait donc être assez facilement inclus comme critère de sélection dans les schémas des ruminants laitiers, si les preuves de son intérêt sont apportées. De plus, le rapport TB/TP était corrélé positivement aux mammites cliniques et aux SCS (de 0,09 à 0,20 en début de lactation), mais aussi à certains caractères de fertilité (de 0,14 à 0,28 en début de lactation), comme l'intervalle entre vêlage et la première insémination (IVIA1) ou l'intervalle entre le vêlage et l'insémination fécondante (IVIF).

Ces résultats corroborent donc l'idée que le rapport TB/TP pourrait être un outil à faible coût permettant de contrôler des caractères de santé et de fertilité majeurs dans la phase critique de la lactation, et devenir un caractère utile pour augmenter la robustesse des ruminants laitiers.

Aujourd'hui, l'objectif de sélection des brebis laitières en France intègre l'amélioration de la quantité de lait, des matières, de la morphologie mammaire et des CCS. Nos résultats suggèrent que l'introduction des CCS dans l'objectif de sélection permet déjà une réponse favorable sur le risque de maladie métabolique du début de lactation, sans qu'on sache s'il contrebalance l'effet défavorable lié à l'augmentation de la production laitière. Il serait donc intéressant d'évaluer l'intérêt d'introduire dans l'objectif également le caractère TB/TP, mesuré en début de lactation et corrigé de l'effet de la production laitière, afin d'améliorer la résistance au déficit énergétique. Il pourrait être pertinent d'observer les éventuelles conséquences d'une telle sélection sur la longévité fonctionnelle, les mammites, la production laitière, l'efficacité métabolique et l'efficacité alimentaire. Pour cela il faudrait estimer les paramètres génétiques de ce caractère, TB/TP, et l'ensemble des corrélations génétiques avec les autres caractères d'intérêt.

L'objectif de mon projet doctoral était de contribuer à la compréhension des mécanismes liant déficit énergétique et prédisposition aux mammites en début de lactation. Cet objectif répond en partie aux attentes des éleveurs de ruminants laitiers dont l'objectif est de mieux maîtriser les maladies, et les mammites en particulier, et de réduire les pertes économiques qu'elles provoquent, mais aussi à celles de la société qui recherche des produits de qualité sanitaire élevée et des systèmes d'élevages respectueux du bien-être des animaux.

D'un point de vue méthodologique, nous avons montré l'intérêt d'utiliser le sang total pour comprendre et décrire des mécanismes liés à une épreuve inflammatoire locale. En effet, nos résultats ont montré que l'étude du transcriptome sanguin avait permis d'identifier les mécanismes immunitaires activées en réponse à une inflammation mammaire ; nous avons donc validé l'utilisation de cette approche pour l'étude d'un processus inflammatoire local. De plus, nous avons montré que le bilan énergétique avait un effet sur le métabolisme des leucocytes, ce qui permet également de valider cette approche pour étudier des phénomènes semblables à l'échelle systémique.

Le modèle d'épreuve inflammatoire utilisant l'association Pam3CSK4/MDP a également été validé pour induire une inflammation mammaire, avec des répercussions non seulement locales mais aussi systémiques; cependant d'autres analyses dont celle du transcriptome sont nécessaires afin de vérifier si la réponse induite mime de manière suffisante les voies immunitaires modifiées par une infection par les Staphylocoques.

D'un point de vue biologique, notre plan expérimental ne nous a pas permis de révéler des conséquences négatives de la restriction énergétique sur la réponse inflammatoire. Au vu de ces résultats et de la bibliographie abondante sur cette question, nous pensons que la restriction énergétique n'a vraisemblablement que peu d'effet direct sur la réponse immunitaire. En revanche, nous avons montré qu'il existait un lien étroit entre immunité et métabolisme, notamment via le facteur de transcription SREBF1, qui comme le facteur de transcription PPARγ semble agir comme pivot entre immunité et métabolisme lipidique.

Le résultat le plus marquant de cette thèse, bien qu'inattendu, est la mise en évidence d'une relation d'ordre génétique entre la prédisposition aux mammites et le métabolisme énergétique, dont la cétose. En effet, la restriction énergétique a des conséquences exacerbées chez les brebis CCS+ qui sont plus sensibles aux mammites, par rapport aux brebis CCS-.

Ces résultats obtenus dans le contexte d'un essai sur un lot expérimental de faible effectif (48 brebis réparties de façon équilibrée entre quatre groupes selon la lignée et le régime) a été validé à l'échelle d'un effectif bien plus grand (>1000 animaux) et d'une dizaine d'années. Ce travail, outre le fait qu'il conforte l'existence d'un lien génétique entre métabolisme et immunité, propose de nouvelles voies d'amélioration génétique des ruminants laitiers. En particulier, le rapport TB/TP pourrait devenir, alors qu'il est déjà disponible et acquis à très faible coût, un moyen permettant d'améliorer des caractères de santé et de fertilité à une phase critique de la lactation et devenir ainsi un caractère utile pour accroître la robustesse des ruminants laitiers.

A

Albaaj, Foucras, and Raboisson. 2017. High somatic cell counts and changes in milk fat and protein contents around insemination are negatively associated with conception in dairy cows. Theriogenology 88:18–27. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.09.043.

Allain, C., Aurel, MR., Pailler, F., Portes, D., Menras, J.M., Carriere, F., Cluzel, F., Duvallon, O., Pena-Arnaud, B., Caillat, H., Marie-Etancelin, C., Arhainx, J., Dion, S., Bergonier, D., Foucras, G., and Rupp, R. 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.. Rencontre Rech. Rumin. 17ième Édition.

Allen, M.S., B.J. Bradford, and K.J. Harvatine. 2005. The cow as a model to study food intake regulation. Annu. Rev. Nutr. 25:523–547. doi:10.1146/annurev.nutr.25.050304.092704.

Allen, M.S., B.J. Bradford, and M. Oba. 2009. BOARD-INVITED REVIEW: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. J. Anim. Sci. 87:3317–3334. doi:10.2527/jas.2009-1779.

Anders, S., and W. Huber. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol. 11:R106. doi:10.1186/gb-2010-11-10-r106.

Anders, S., P.T. Pyl, and W. Huber. 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics 31:166–169. doi:10.1093/bioinformatics/btu638.

Andersson, L. 1988. Subclinical ketosis in dairy cows. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 4:233–251.

Ariznabarreta, A., C. Gonzalo, and F. San Primitivo. 2002. Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to staphylococci. J. Dairy Sci. 85:1370–1375. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74203-3.

B

Banos, G., M.P. Coffey, and S. Brotherstone. 2005. Modeling Daily Energy Balance of Dairy Cows in the First Three Lactations. J. Dairy Sci. 88:2226–2237. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72898-8.

Bar, D., L.W. Tauer, G. Bennett, R.N. González, J.A. Hertl, Y.H. Schukken, H.F. Schulte, F.L. Welcome, and Y.T. Gröhn. 2008. The cost of generic clinical mastitis in dairy cows as estimated by using dynamic programming. J. Dairy Sci. 91:2205–2214. doi:10.3168/jds.2007-0573.

Barillet, F., and B. Bonaïti. 1992. La production laitière des ruminants traits. INRA Prod. Anim. 117–121.

Bell, A.W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation.. J. Anim. Sci. 73:2804–2819. doi:10.2527/1995.7392804x.

Bensinger, S.J., and P. Tontonoz. 2008. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. Nature 454:470–477. doi:10.1038/nature07202.

Bergonier, D., Blanc, M.C., Fleury, B., Lagriffoul, G., Barillet, F., and Berthelot, X. 1997. Les mammites des ovins et des caprins laitiers : étiologie, épidémiologie, contrôle. Rencontres Rech. Rumin. 4:251‑60.

Bergonier, D., R. de Crémoux, R. Rupp, G. Lagriffoul, and X. Berthelot. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. Vet. Res. 34:689–716. doi:10.1051/vetres:2003030.

Bines, J.A., and S.V. Morant. 1983. The effect of body condition on metabolic changes associated with intake of food by the cow. Br. J. Nutr. 50:81–89.

Bonnefont, C.M., M. Toufeer, C. Caubet, E. Foulon, C. Tasca, M.-R. Aurel, D. Bergonier, S. Boullier, C. Robert-Granié, G. Foucras, and R. Rupp. 2011. Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus. BMC Genomics 12:1–16. doi:10.1186/1471-2164-12-208.

Bonnefont, C.M.D., P. Rainard, P. Cunha, F.B. Gilbert, M. Toufeer, M.-R. Aurel, R. Rupp, and G. Foucras. 2012. Genetic susceptibility to S. aureus mastitis in sheep: differential expression of mammary epithelial cells in response to live bacteria or supernatant. Physiol. Genomics 44:403–416. doi:10.1152/physiolgenomics.00155.2011.

Borgström, E., S. Lundin, and J. Lundeberg. 2011. Large scale library generation for high throughput sequencing. PloS One 6:e19119. doi:10.1371/journal.pone.0019119.

Bosquet, G., Faroult, B., Labbé, J-F., Le Page, P., and Séryes, F. 2013. SNGTV. Paris, France.

Botrel, M.-A., M. Haenni, E. Morignat, P. Sulpice, J.-Y. Madec, and D. Calavas. 2010. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France. Foodborne Pathog. Dis. 7:479–487. doi:10.1089/fpd.2009.0425.

Bouvier-Muller, J., C. Allain, F. Enjalbert, G. Tabouret, D. Portes, C. Caubet, C. Tasca, G. Foucras, and R. Rupp. 2016. Response to dietary-induced energy restriction in dairy sheep divergently selected for resistance or susceptibility to mastitis. J. Dairy Sci. 99:480–492. doi:10.3168/jds.2015-9785.

Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, C.G. Elsik, R.L. Tellam, K.C. Worley, R.A. Gibbs, D.M. Muzny, G.M. Weinstock, D.L. Adelson, E.E. Eichler, L. Elnitski, R. Guigó, D.L. Hamernik, S.M. Kappes, H.A. Lewin, D.J. Lynn, F.W. Nicholas, A. Reymond, M. Rijnkels, L.C. Skow, E.M. Zdobnov, L. Schook, J. Womack, T. Alioto, S.E. Antonarakis, A. Astashyn, C.E. Chapple, H.-C. Chen, J. Chrast, F. Câmara, O. Ermolaeva, C.N. Henrichsen, W. Hlavina, Y. Kapustin, B. Kiryutin, P. Kitts, F. Kokocinski, M. Landrum, D. Maglott, K. Pruitt, V. Sapojnikov, S.M. Searle, V. Solovyev, A. Souvorov, C. Ucla, C. Wyss, J.M. Anzola, D. Gerlach, E. Elhaik, D. Graur, J.T. Reese, R.C. Edgar, J.C. McEwan, G.M. Payne, J.M. Raison, T. Junier, E.V. Kriventseva, E. Eyras, M. Plass, R. Donthu, D.M. Larkin, J. Reecy, M.Q. Yang, L. Chen, Z. Cheng, C.G. Chitko-McKown, G.E. Liu, L.K. Matukumalli, J. Song, B. Zhu, D.G. Bradley, F.S.L. Brinkman, L.P.L. Lau, M.D. Whiteside, A. Walker, T.T. Wheeler, T. Casey, J.B. German, D.G. Lemay, N.J. Maqbool, A.J. Molenaar, S. Seo, P. Stothard, C.L. Baldwin, R. Baxter, C.L. Brinkmeyer-Langford, W.C. Brown, C.P. Childers, T. Connelley, S.A. Ellis, K. Fritz, E.J. Glass, C.T.A. Herzig, A. Iivanainen, K.K. Lahmers, A.K. Bennett, C.M. Dickens, J.G.R. Gilbert, D.E. Hagen, H. Salih, J. Aerts, A.R. Caetano, B. Dalrymple, J.F. Garcia, C.A. Gill, S.G. Hiendleder, E. Memili, D. Spurlock, J.L. Williams, L. Alexander, M.J. Brownstein, L. Guan, R.A. Holt, S.J.M. Jones, M.A. Marra, R. Moore, S.S. Moore, A. Roberts, M. Taniguchi, R.C. Waterman, J. Chacko, M.M. Chandrabose, A. Cree, M.D. Dao, H.H. Dinh, R.A. Gabisi, S. Hines, J. Hume, S.N. Jhangiani, V. Joshi, C.L. Kovar, L.R. Lewis, Y.-S. Liu, J. Lopez, M.B. Morgan, N.B. Nguyen, G.O. Okwuonu, S.J. Ruiz, J. Santibanez, R.A. Wright, C. Buhay, Y. Ding, S. Dugan-Rocha, J. Herdandez, M. Holder, A. Sabo, A. Egan, J. Goodell, K. Wilczek-Boney, G.R. Fowler, M.E. Hitchens, R.J. Lozado, C. Moen, D. Steffen, J.T. Warren, J. Zhang, R. Chiu, J.E. Schein, K.J. Durbin, P. Havlak, H. Jiang, Y. Liu, X. Qin, Y. Ren, Y. Shen, H. Song, S.N. Bell, C. Davis, A.J. Johnson, S. Lee, L.V. Nazareth, B.M. Patel, L.-L. Pu, S. Vattathil, R.L. Williams, S. Curry, C. Hamilton, E. Sodergren, D.A. Wheeler, W. Barris, G.L. Bennett, A. Eggen, R.D. Green, G.P. Harhay, M. Hobbs, O. Jann, J.W. Keele, M.P. Kent, S. Lien, S.D. McKay, S. McWilliam, A. Ratnakumar, R.D. Schnabel,

T. Smith, W.M. Snelling, T.S. Sonstegard, R.T. Stone, Y. Sugimoto, A. Takasuga, J.F. Taylor, C.P. Van Tassell, M.D. Macneil, A.R.R. Abatepaulo, C.A. Abbey, V. Ahola, I.G. Almeida, A.F. Amadio, E. Anatriello, S.M. Bahadue, F.H. Biase, C.R. Boldt, J.A. Carroll, W.A. Carvalho, E.P. Cervelatti, E. Chacko, J.E. Chapin, Y. Cheng, J. Choi, A.J. Colley, T.A. de Campos, M. De Donato, I.K.F. de M. Santos, C.J.F. de Oliveira, H. Deobald, E. Devinoy, K.E. Donohue, P. Dovc, A. Eberlein, C.J. Fitzsimmons, A.M. Franzin, G.R. Garcia, S. Genini, C.J. Gladney, J.R. Grant, M.L. Greaser, J.A. Green, D.L. Hadsell, H.A. Hakimov, R. Halgren, J.L. Harrow, E.A. Hart, N. Hastings, M. Hernandez, Z.-L. Hu, A. Ingham, T. Iso-Touru, C. Jamis, K. Jensen, D. Kapetis, T. Kerr, S.S. Khalil, H. Khatib, D. Kolbehdari, C.G. Kumar, D. Kumar, R. Leach, J.C.-M. Lee, C. Li, K.M. Logan, R. Malinverni, E. Marques, W.F. Martin, N.F. Martins, S.R. Maruyama, R. Mazza, K.L. McLean, J.F. Medrano, B.T. Moreno, D.D. Moré, C.T. Muntean, H.P. Nandakumar, M.F.G. Nogueira, I. Olsaker, S.D. Pant, F. Panzitta, R.C.P. Pastor, M.A. Poli, N. Poslusny, S. Rachagani, S. Ranganathan, A. Razpet, P.K. Riggs, G. Rincon, N. Rodriguez-Osorio, S.L. Rodriguez-Zas, N.E. Romero, A. Rosenwald, L. Sando, S.M. Schmutz, L. Shen, L. Sherman, B.R. Southey, Y.S. Lutzow, J.V. Sweedler, I. Tammen, B.P.V.L. Telugu, J.M. Urbanski, Y.T. Utsunomiya, C.P. Verschoor, A.J. Waardenberg, Z. Wang, R. Ward, R. Weikard, T.H. Welsh, S.N. White, L.G. Wilming, K.R. Wunderlich, J. Yang, and F.-Q. Zhao. 2009. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. Science 324:522–528. doi:10.1126/science.1169588.

C

Cánovas, A., G. Rincon, A. Islas-Trejo, S. Wickramasinghe, and J.F. Medrano. 2010. SNP discovery in the bovine milk transcriptome using RNA-Seq technology. Mamm. Genome 21:592–598. doi:10.1007/s00335-010-9297-z.

Castrillo, A., and P. Tontonoz. 2004. NUCLEAR RECEPTORS IN MACROPHAGE BIOLOGY: At the Crossroads of Lipid Metabolism and Inflammation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 20:455–480. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.012103.134432.

Coffey, M.P., G.C. Emmans, and S. Brotherstone. 2001. Genetic evaluation of dairy bulls for energy balance traits using random regression. Anim. Sci. 73:29–40. doi:10.1017/S1357729800058021.

Contreras, G.A., N.J. O'Boyle, T.H. Herdt, and L.M. Sordillo. 2010. Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. J. Dairy Sci. 93:2508–2516. doi:10.3168/jds.2009-2876.

D

Dann, H.M., N.B. Litherland, J.P. Underwood, M. Bionaz, A. D'Angelo, J.W. McFadden, and J.K. Drackley. 2006. Diets During Far-Off and Close-Up Dry Periods Affect Periparturient Metabolism and Lactation in Multiparous Cows1. J. Dairy Sci. 89:3563–3577. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72396-7.

Detilleux, J.C., M.E. Kehrli, J.R. Stabel, A.E. Freeman, and D.H. Kelley. 1995. Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. Vet. Immunol. Immunopathol. 44:251–267.

Dillies, M.-A., A. Rau, J. Aubert, C. Hennequet-Antier, M. Jeanmougin, N. Servant, C. Keime, G. Marot, D. Castel, J. Estelle, G. Guernec, B. Jagla, L. Jouneau, D. Laloë, C. Le Gall, B. Schaëffer, S. Le Crom, M. Guedj, F. Jaffrézic, and French StatOmique Consortium. 2013. A

comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. Brief. Bioinform. 14:671–683. doi:10.1093/bib/bbs046.

Drackley, J.K. 1999. Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier?. J. Dairy Sci. 82:2259–2273. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75474-3.

E

East, N.E. 1983. Pregnancy toxemia, abortions, and periparturient diseases. Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract. 5:601–618.

Emmans, G.C. 1994. Effective energy: a concept of energy utilization applied across species. Br. J. Nutr. 71:801–821. doi:10.1079/BJN19940188.

F

Forbes, J.M. 1969. The effect of pregnancy and fatness on the volume of rumen contents in the ewe. J. Agric. Sci. 72:119–121. doi:10.1017/S0021859600020475.

Fournier, B., and D.J. Philpott. 2005. Recognition of Staphylococcus aureus by the innate immune system. Clin. Microbiol. Rev. 18:521–540. doi:10.1128/CMR.18.3.521-540.2005.

Franklin, S.T., J.W. Young, and B.J. Nonnecke. 1991. Effects of Ketones, Acetate, Butyrate, and Glucose on Bovine Lymphocyte Proliferation1,2. J. Dairy Sci. 74:2507–2514. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78428-2.

Frauwirth, K.A., J.L. Riley, M.H. Harris, R.V. Parry, J.C. Rathmell, D.R. Plas, R.L. Elstrom, C.H. June, and C.B. Thompson. 2002. The CD28 Signaling Pathway Regulates Glucose Metabolism. Immunity 16:769–777. doi:10.1016/S1074-7613(02)00323-0.

Friggens, N.C., C. Ridder, and P. Løvendahl. 2007. On the use of milk composition measures to predict the energy balance of dairy cows. J. Dairy Sci. 90:5453–5467. doi:10.3168/jds.2006-821.

G

Gadoud, R. 1992. Nutrition et alimentation des animaux d'élevage. Foucher.

Genini, S., B. Badaoui, G. Sclep, S.C. Bishop, D. Waddington, M.-H. Pinard van der Laan, C. Klopp, C. Cabau, H.-M. Seyfert, W. Petzl, K. Jensen, E.J. Glass, A. de Greeff, H.E. Smith, M.A. Smits, I. Olsaker, G.M. Boman, G. Pisoni, P. Moroni, B. Castiglioni, P. Cremonesi, M. Del Corvo, E. Foulon, G. Foucras, R. Rupp, and E. Giuffra. 2011. Strengthening insights into host responses to mastitis infection in ruminants by combining heterogeneous microarray data sources. BMC Genomics 12:225. doi:10.1186/1471-2164-12-225.

Goff, J.P. 2006. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. J. Dairy Sci. 89:1292–1301. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72197-X.

Goff, J.P., and R.L. Horst. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. J. Dairy Sci. 80:1260–1268. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)76055-7.

González-García, E., A. Tesniere, S. Camous, F. Bocquier, F. Barillet, and P. Hassoun. 2015. The effects of parity, litter size, physiological state, and milking frequency on the metabolic profile of Lacaune dairy ewes. Domest. Anim. Endocrinol. 50:32–44. doi:10.1016/j.domaniend.2014.07.001.

Grieve, D.G., S. Korver, Y.S. Rijpkema, and G. Hof. 1986. Relationship between milk composition and some nutritional parameters in early lactation. Livest. Prod. Sci. 14:239–254. doi:10.1016/0301-6226(86)90083-7.

Gross, J., H.A. van Dorland, R.M. Bruckmaier, and F.J. Schwarz. 2011. Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation. J. Dairy Sci. 94:1820–1830. doi:10.3168/jds.2010-3707.

Guidry, Paape, and Pearson. 1976. Effects of parturition and lactation on blood and milk cell concentrations, corticosteroids, and neutrophil phagocytosis in the cow.. Am. J. Vet. Res. 37:1195–1200.

H

Hamid, J.S., P. Hu, N.M. Roslin, V. Ling, C.M.T. Greenwood, and J. Beyene. 2009. Data Integration in Genetics and Genomics: Methods and Challenges. Hum. Genomics Proteomics 1. doi:10.4061/2009/869093.

Hawkins, R.D., G.C. Hon, and B. Ren. 2010. Next-generation genomics: an integrative approach. Nat. Rev. Genet. 11:476–486. doi:10.1038/nrg2795.

Hayirli, A., R.R. Grummer, E.V. Nordheim, and P.M. Crump. 2002. Animal and Dietary Factors Affecting Feed Intake During the Prefresh Transition Period in Holsteins. J. Dairy Sci. 85:3430–3443. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74431-7.

Heringstad, B., Y.M. Chang, D. Gianola, and G. Klemetsdal. 2005. Genetic analysis of clinical mastitis, milk fever, ketosis, and retained placenta in three lactations of Norwegian red cows. J. Dairy Sci. 88:3273–3281. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)73010-1.

Heringstad, B., G. Klemetsdal, and J. Ruane. 2000. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. Livest. Prod. Sci. 64:95–106. doi:10.1016/S0301-6226(99)00128-1.

Hochberg, Y., and Y. Benjamini. 1990. More powerful procedures for multiple significance testing. Stat. Med. 9:811–818. doi:10.1002/sim.4780090710.

Holzinger, E.R., and M.D. Ritchie. 2012. Integrating heterogeneous high-throughput data for meta-dimensional pharmacogenomics and disease-related studies. Pharmacogenomics 13:213–222. doi:10.2217/pgs.11.145.

I

Im, S.-S., L. Yousef, C. Blaschitz, J.Z. Liu, R.A. Edwards, S.G. Young, M. Raffatellu, and T.F. Osborne. 2011. Linking Lipid Metabolism to the Innate Immune Response in Macrophages through Sterol Regulatory Element Binding Protein-1a. Cell Metab. 13:540–549. doi:10.1016/j.cmet.2011.04.001.

International Sheep Genomics Consortium, A.L. Archibald, N.E. Cockett, B.P. Dalrymple, T. Faraut, J.W. Kijas, J.F. Maddox, J.C. McEwan, V. Hutton Oddy, H.W. Raadsma, C. Wade, J. Wang, W. Wang, and X. Xun. 2010. The sheep genome reference sequence: a work in progress. Anim. Genet. 41:449–453. doi:10.1111/j.1365-2052.2010.02100.x.

Ishikawa, H. 1987. Observation of lymphocyte function in perinatal cows and neonatal calves. Nihon Juigaku Zasshi Jpn. J. Vet. Sci. 49:469–475.

J

Jánosi, S., M. Kulcsár, P. Kóródi, L. Kátai, J. Reiczigel, S.J. Dieleman, J.A. Nikolic, G. Sályi, P. Ribiczey-Szabó, and G. Huszenicza. 2003. Energy imbalance related predisposition to mastitis in group-fed high-producing postpartum dairy cows. Acta Vet. Hung. 51:409–424. doi:10.1556/AVet.51.2003.3.14.

K

Kashiwazaki, Y., Y. Maede, and S. Namioka. 1985. Transformation of bovine peripheral blood lymphocytes in the perinatal period. Nihon Juigaku Zasshi Jpn. J. Vet. Sci. 47:337–339.

Kehrli, M.E., B.J. Nonnecke, and J.A. Roth. 1989. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. Am. J. Vet. Res. 50:207–214.

Kidani, Y., H. Elsaesser, M.B. Hock, L. Vergnes, K.J. Williams, J.P. Argus, B.N. Marbois, E. Komisopoulou, E.B. Wilson, T.F. Osborne, T.G. Graeber, K. Reue, D.G. Brooks, and S.J. Bensinger. 2013. Sterol regulatory element-binding proteins are essential for the metabolic programming of effector T cells and adaptive immunity. Nat. Immunol. 14:489–499. doi:10.1038/ni.2570.

Kluciński, W., A. Degórski, E. Miernik-Degórska, S. Targowski, and A. Winnicka. 1988. Effect of ketone bodies on the phagocytic activity of bovine milk macrophages and polymorphonuclear leukocytes. Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe A 35:632–639.

Koeck, A., J. Jamrozik, G.J. Kistemaker, F.S. Schenkel, R.K. Moore, D.M. Lefebvre, D.F. Kelton, and F. Miglior. 2016. Genetic and phenotypic associations of milk β-hydroxybutyrate with ketosis in Canadian Holsteins. Can. J. Anim. Sci. 96:302–305. doi:10.1139/cjas-2015-0206.

Koeck, A., J. Jamrozik, F.S. Schenkel, R.K. Moore, D.M. Lefebvre, D.F. Kelton, and F. Miglior. 2014. Genetic analysis of milk β-hydroxybutyrate and its association with fat-to-protein ratio, body condition score, clinical ketosis, and displaced abomasum in early first lactation of Canadian Holsteins. J. Dairy Sci. 97:7286–7292. doi:10.3168/jds.2014-8405.

L

Lacetera, N., O. Franci, D. Scalia, U. Bernabucci, B. Ronchi, and A. Nardone. 2002. Effects of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate on functions of mononuclear cells obtained from ewes. Am. J. Vet. Res. 63:414–418.

Lacetera, N., D. Scalia, O. Franci, U. Bernabucci, B. Ronchi, and A. Nardone. 2004. Short Communication: Effects of Nonesterified Fatty Acids on Lymphocyte Function in Dairy Heifers. J. Dairy Sci. 87:1012–1014. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73246-4.

Le Roux, Y., F. Laurent, and F. Moussaoui. 2003. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. Vet. Res. 34:629–645. doi:10.1051/vetres:2003021.

Li, W., R.A. Richter, Y. Jung, Q. Zhu, and R.W. Li. 2016. Web-based bioinformatics workflows for end-to-end RNA-seq data computation and analysis in agricultural animal species. BMC Genomics 17:761. doi:10.1186/s12864-016-3118-z.

Liao, Y., G.K. Smyth, and W. Shi. 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. Bioinformatics 30:923–930. doi:10.1093/bioinformatics/btt656.

Love, M.I., W. Huber, and S. Anders. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol. 15:550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.

Lutzow, Y.C.S., L. Donaldson, C.P. Gray, T. Vuocolo, R.D. Pearson, A. Reverter, K.A. Byrne, P.A. Sheehy, R. Windon, and R.L. 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. doi:10.1186/1746-6148-4-18.

M

Maxymiv, N.G., M. Bharathan, and I.K. Mullarky. 2012. Bovine mammary dendritic cells: a heterogeneous population, distinct from macrophages and similar in phenotype to afferent

lymph veiled cells. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 35:31–38. doi:10.1016/j.cimid.2011.09.009.

McArt, J.A.A., D.V. Nydam, G.R. Oetzel, T.R. Overton, and P.A. Ospina. 2013. Elevated non-esterified fatty acids and β-hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. Vet. J. 198:560–570. doi:10.1016/j.tvjl.2013.08.011.

Mørk, T., S. Waage, T. Tollersrud, B. Kvitle, and S. Sviland. 2007. Clinical mastitis in ewes; bacteriology, epidemiology and clinical features. Acta Vet. Scand. 49:23. doi:10.1186/1751-0147-49-23.

Moyes, K.M. 2010. Greater expression of TLR2, TLR4, and IL6 due to negative energy balance is associated with lower expression of HLA-DRA and HLA-A in bovine blood neutrophils after intramammary mastitis challenge with Streptococcus uberis. Funct. Amp Integr. Genomics 10:53–61. doi:10.1007/s10142-009-0154-7.

Moyes, K.M., J.K. Drackley, J.L. Salak-Johnson, D.E. Morin, J.C. Hope, and J.J. Loor. 2009. Dietary-induced negative energy balance has minimal effects on innate immunity during a Streptococcus uberis mastitis challenge in dairy cows during midlactation. J. Dairy Sci. 92:4301–4316. doi:10.3168/jds.2009-2170.

N

Nafikov, R.A., and D.C. Beitz. 2007. Carbohydrate and Lipid Metabolism in Farm Animals. J. Nutr. 137:702–705.

Nagalakshmi, U., Z. Wang, K. Waern, C. Shou, D. Raha, M. Gerstein, and M. Snyder. 2008. The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing. Science 320:1344–1349. doi:10.1126/science.1158441.

Negussie, E., I. Strandén, and E.A. Mäntysaari. 2013. Genetic associations of test-day fat:protein ratio with milk yield, fertility, and udder health traits in Nordic Red cattle. J. Dairy Sci. 96:1237–1250. doi:10.3168/jds.2012-5720.

Newbould, F.H. 1976. Phagocytic acitivity of bovine leukocytes during pregnancy.. Can. J. Comp. Med. 40:111–116.

Nyman, A.-K., U. Emanuelson, K. Holtenius, K.L. Ingvartsen, T. Larsen, and K.P. Waller. 2008. Metabolites and immune variables associated with somatic cell counts of primiparous dairy cows. J. Dairy Sci. 91:2996–3009. doi:10.3168/jds.2007-0969.

O

Ogola, H., A. Shitandi, and J. Nanua. 2007. Effect of mastitis on raw milk compositional quality. J. Vet. Sci. 8:237–242.

Ollier, S., C. Robert-Granié, L. Bernard, Y. Chilliard, and C. Leroux. 2007. Mammary Transcriptome Analysis of Food-Deprived Lactating Goats Highlights Genes Involved in Milk Secretion and Programmed Cell Death. J. Nutr. 137:560–567.

Ollivier-Bousquet, M. 2002. Milk lipid and protein traffic in mammary epithelial cells: joint and independent pathways. Reprod. Nutr. Dev. 42:149–162.

Oviedo-Boyso, J., J.J. Valdez-Alarcón, M. Cajero-Juárez, A. Ochoa-Zarzosa, J.E. López-Meza, A. Bravo-Patiño, and V.M. Baizabal-Aguirre. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. J. Infect. 54:399–409. doi:10.1016/j.jinf.2006.06.010.

P

Paape, M.J., D.D. Bannerman, X. Zhao, and J.-W. Lee. 2003. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. Vet. Res. 34:597–627. doi:10.1051/vetres:2003024.

Pareek, R., O. Wellnitz, R. Van Dorp, J. Burton, and D. Kerr. 2005. Immunorelevant gene expression in LPS-challenged bovine mammary epithelial cells. J. Appl. Genet. 46:171–177.

Paulrud, C.O. 2005. Basic Concepts of the Bovine Teat Canal. Vet. Res. Commun. 29:215–245. doi:10.1023/B:VERC.0000047496.47571.41.

Perkins, K.H., M.J. VandeHaar, R.J. Tempelman, and J.L. Burton. 2001. Negative Energy Balance Does Not Decrease Expression of Leukocyte Adhesion or Antigen-Presenting Molecules in Cattle1. J. Dairy Sci. 84:421–428. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)74492-X.

Piepers, S., A. Prenafeta, J. Verbeke, A.D. Visscher, R. March, and S.D. Vliegher. 2017. Immune response after an experimental intramammary challenge with killed Staphylococcus aureus in cows and heifers vaccinated and not vaccinated with Startvac, a polyvalent mastitis vaccine. J. Dairy Sci. 100:769–782. doi:10.3168/jds.2016-11269.

Pyörälä, S., and E. Pyörälä. 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. 80:2820–2825. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)76246-5.

R

Rainard, P., A. Fromageau, P. Cunha, and F.B. Gilbert. 2008. Staphylococcus aureus lipoteichoic acid triggers inflammation in the lactating bovine mammary gland. Vet. Res. 39:1, 52. doi:10.1051/vetres:2008034.

Rainard, P., and C. Riollet. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. Vet. Res. 37:32. doi:10.1051/vetres:2006007.

Rajala-Schultz, P.J., Y.T. Gröhn, and C.E. McCulloch. 1999. Effects of Milk Fever, Ketosis, and Lameness on Milk Yield in Dairy Cows. J. Dairy Sci. 82:288–294. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75235-5.

Rastani, R.R., S.M. Andrew, S.A. Zinn, and C.J. Sniffen. 2001. Body Composition and Estimated Tissue Energy Balance in Jersey and Holstein Cows During Early Lactation1. J. Dairy Sci. 84:1201–1209. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)74581-X.

Reif, D.M., B.C. White, and J.H. Moore. 2004. Integrated analysis of genetic, genomic and proteomic data. Expert Rev. Proteomics 1:67–75. doi:10.1586/14789450.1.1.67.

Reynolds, C.K., P.C. Aikman, B. Lupoli, D.J. Humphries, and D.E. Beever. 2003. Splanchnic Metabolism of Dairy Cows During the Transition From Late Gestation Through Early Lactation. J. Dairy Sci. 86:1201–1217. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73704-7.

Rivas, A.L., F.W. Quimby, J. Blue, and O. Coksaygan. 2001. Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology. J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc 13:399–407.

Robinson, J.J., I. McDonald, I. McHattie, and K. Pennie. 1978. Studies on reproduction in prolific ewes. 4. Sequential changes in the maternal body during pregnancy. J. Agric. Sci. 91:291–304. doi:10.1017/S0021859600046372.

Robinson, M.D., and A. Oshlack. 2010. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. Genome Biol. 11:R25. doi:10.1186/gb-2010-11-3-r25.

Rook, J.S. 2000. Pregnancy toxemia of ewes, does, and beef cows. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 16:293–317, vi–vii.

Rook, J.S., G. Scholman, S. Wing-Proctor, and M. Shea. 1990. Diagnosis and control of neonatal losses in sheep. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 6:531–562.

Rougemont, J., A. Amzallag, C. Iseli, L. Farinelli, I. Xenarios, and F. Naef. 2008. Probabilistic base calling of Solexa sequencing data. BMC Bioinformatics 9:431. doi:10.1186/1471-2105-9-431.

Rupp, R., D. Bergonier, S. Dion, M.C. Hygonenq, M.R. Aurel, C. Robert-Granié, and G. Foucras. 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.

Rupp, R., and D. Boichard. 2003. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. Vet. Res. 34:18. doi:10.1051/vetres:2003020.

Rupp, R., V. Clément, A. Piacere, C. Robert-Granié, and 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. 94:3629–3634. doi:10.3168/jds.2010-3694.

Rupp, R., and G. Foucras. 2010. Genetics of mastitis in dairy ruminants. 3rd ed. S.C. Bishop, R.F.E. Axford, F.W. Nicholas, and J.B. Owen, ed. CABI, Wallingford.

Rupp, R., G. Lagriffoul, J.M. Astruc, and F. Barillet. 2003. Genetic parameters for milk somatic cell scores and relationships with production traits in French Lacaune dairy sheep. J. Dairy Sci. 86:1476–1481. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73732-1.

Rupp, R., P. Senin, J. Sarry, C. Allain, C. Tasca, L. Ligat, D. Portes, F. Woloszyn, O. Bouchez, G. Tabouret, M. Lebastard, C. Caubet, G. Foucras, and G. Tosser-Klopp. 2015. A Point Mutation in Suppressor of Cytokine Signalling 2 (Socs2) Increases the Susceptibility to Inflammation of the Mammary Gland while Associated with Higher Body Weight and Size and Higher Milk Production in a Sheep Model. PLOS Genet. 11:e1005629. doi:10.1371/journal.pgen.1005629.

Russel, A.J.F., R.G. Gunn, and J.M. Doney. 1968. Components of weight loss in pregnant hill ewes during winter. Anim. Sci. 10:43–51. doi:10.1017/S0003356100025927.

S

Scalia, D., N. Lacetera, U. Bernabucci, K. Demeyere, L. Duchateau, and C. Burvenich. 2006. In vitro effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability. J. Dairy Sci. 89:147–154. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72078-1.

Schukken, Y.H., V. Bronzo, C. Locatelli, C. Pollera, N. Rota, A. Casula, F. Testa, L. Scaccabarozzi, R. March, D. Zalduendo, R. Guix, and P. Moroni. 2014. Efficacy of vaccination on Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. J. Dairy Sci. 97:5250–5264. doi:10.3168/jds.2014-8008.

Schurch, N.J., P. Schofield, M. Gierliński, C. Cole, A. Sherstnev, V. Singh, N. Wrobel, K. Gharbi, G.G. Simpson, T. Owen-Hughes, M. Blaxter, and G.J. Barton. 2016. How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use?. RNA N. Y. N 22:839–851. doi:10.1261/rna.053959.115.

Seegers, H., C. Fourichon, and F. Beaudeau. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. Vet. Res. 34:475–491. doi:10.1051/vetres:2003027.

Shook, G.E. 2006. Major Advances in Determining Appropriate Selection Goals. J. Dairy Sci. 89:1349–1361. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72202-0.

Sigurdsson, H. 1988. Susceptibility to pregnancy disease in ewes and its relation to gestational diabetes. Acta Vet. Scand. 29:407–414.

Sniffen, C.J., J.D. O'Connor, V. Soest, P. J, D.G. Fox, and J.B. Russell. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability.. J. Anim. Sci. 70:3562–3577. doi:10.2527/1992.70113562x.

Strandberg, Y., C. Gray, T. Vuocolo, L. Donaldson, M. Broadway, and R. Tellam. 2005. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. Cytokine 31:72–86. doi:10.1016/j.cyto.2005.02.010.

Sugimoto, M., A. Fujikawa, J.E. Womack, and Y. Sugimoto. 2006. Evidence that bovine forebrain embryonic zinc finger-like gene influences immune response associated with mastitis resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103:6454–6459. doi:10.1073/pnas.0601015103.

Suriyasathaporn, W., A.J.J.M. Daemen, E.N. Noordhuizen-Stassen, S.J. Dieleman, M. Nielen, and Y.H. Schukken. 1999. β-hydroxybutyrate levels in peripheral blood and ketone bodies supplemented in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes. Vet. Immunol. Immunopathol. 68:177–186. doi:10.1016/S0165-2427(99)00017-3.

Suriyasathaporn, W., C. Heuer, E.N. Noordhuizen-Stassen, and Y.H. Schukken. 2000. Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. Vet. Res. 31:397–412. doi:10.1051/vetres:2000128.

Sutra, L., and B. Poutrel. 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to Staphylococcus aureus. J. Med. Microbiol. 40:79–89. doi:10.1099/00222615-40-2-79.

Suzuki, S., N. Ono, C. Furusawa, B.-W. Ying, and T. Yomo. 2011. Comparison of sequence reads obtained from three next-generation sequencing platforms. PloS One 6:e19534. doi:10.1371/journal.pone.0019534.

Swanson, K.M., K. Stelwagen, J. Dobson, H.V. Henderson, S.R. Davis, V.C. Farr, and 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. doi:10.3168/jds.2008-1382.

T

Telang, S., B.F. Clem, A.C. Klarer, A.L. Clem, J.O. Trent, R. Bucala, and J. Chesney. 2012. Small molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase suppresses t cell activation. J. Transl. Med. 10:95. doi:10.1186/1479-5876-10-95.

Toufeer, M., C.M.D. Bonnefont, E. Foulon, C. Caubet, C. Tasca, M.-R. Aurel, C. Robert-Granié, R. Rupp, and G. Foucras. 2011. Gene Expression Profiling of Dendritic Cells Reveals Important Mechanisms Associated with Predisposition to Staphylococcus Infections. PLOS ONE 6:e22147. doi:10.1371/journal.pone.0022147.

Trapnell, C., B.A. Williams, G. Pertea, A. Mortazavi, G. Kwan, M.J. van Baren, S.L. Salzberg, B.J. Wold, and L. Pachter. 2010. Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. Nat. Biotechnol. 28:511–515. doi:10.1038/nbt.1621.

U

Underhill, D.M., A. Ozinsky, A.M. Hajjar, A. Stevens, C.B. Wilson, M. Bassetti, and A. Aderem. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. Nature 402:39–43. doi:10.1038/35005543.

V

Vandermeerschen-Doizé, F., and R. Paquay. 1984. Effects of continuous long-term intravenous infusion of long-chain fatty acids on feeding behaviour and blood components of adult sheep. Appetite 5:137–146.

Varga, T., and L. Nagy. 2008. Nuclear receptors, transcription factors linking lipid metabolism and immunity: the case of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. Eur. J. Clin. Invest. 38:695–707. doi:10.1111/j.1365-2362.2008.02022.x.

de Vries, M.J., and R.F. Veerkamp. 2000. Energy Balance of Dairy Cattle in Relation to Milk Production Variables and Fertility. J. Dairy Sci. 83:62–69. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)74856-9.

W

Weller, J.I., A. Saran, and Y. Zeliger. 1992. Genetic and environmental relationships among somatic cell count, bacterial infection, and clinical mastitis. J. Dairy Sci. 75:2532–2540. doi:10.3168/jds.S0022-0302(92)78015-1.

Zarrin, M., O. Wellnitz, H.A. van Dorland, and R.M. Bruckmaier. 2014. Induced hyperketonemia affects the mammary immune response during lipopolysaccharide challenge in dairy cows. J. Dairy Sci. 97:330–339. doi:10.3168/jds.2013-7222.

Z

Zheng, J., A.D. Watson, and D.E. Kerr. 2006. Genome-wide expression analysis of lipopolysaccharide-induced mastitis in a mouse model. Infect. Immun. 74:1907–1915. doi:10.1128/IAI.74.3.1907-1915.2006.

Zwald, N.R., K.A. Weigel, Y.M. Chang, R.D. Welper, and J.S. Clay. 2004. Genetic Selection for Health Traits Using Producer-Recorded Data. II. Genetic Correlations, Disease Probabilities, and Relationships with Existing Traits. J. Dairy Sci. 87:4295–4302. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73574-2.

Publications

Bouvier-Muller J., Allain C., Enjalbert F., Tabouret G., Portes D., Caubet C., Tasca C., Foucras G. and Rupp R. Response to dietary-induced energy restriction in dairy sheep divergently selected for resistance or susceptibility to mastitis. J. Dairy Sci. 99, 480-492 (2016).

Bouvier-Muller J., Allain C., Noirot C., Enjalbert F., Portes D., Rupp R. et Foucras G. Bilan énergétique négatif et inflammation mammaire : analyse du transcriptome sanguin dans un modèle ovin. Renc. Rech. Ruminants, 23 (2016).

Bouvier-Muller J., Allain C., Tabouret G., Enjalbert F., Portes D., Noirot C., Rupp R. and Foucras G. Whole blood transcriptome analysis reveals potential competition in metabolic pathways between negative energy balance and response to inflammatory challenge. Sci. Rep. 7:2379 (2017).

Communications orales

19ième Séminaire des thésards du département de génétique animale - 2016, Toulouse, France.

Bouvier-Muller J., Allain C., Noirot C., Portes D., Rupp R. and Foucras G. Contribution of genetic background, energy status and their interaction on the immune responsiveness for resistance to mastitis.

6th IDF International Mastitis Conference - 2016, Cité des Congrès, Nantes, France.

Bouvier-Muller J., Allain C., Noirot C., Portes D., Rupp R. and Foucras G. Effect of an energy restriction in blood cells transcriptome of dairy ewes during an inflammatory challenge.

23ième Journées 3R - 2016, Cité des Sciences, Paris, France.

Bouvier-Muller J., Allain C., Noirot C., Enjalbert F., Portes D., Rupp R. and Foucras G. Bilan énergétique négatif et inflammation mammaire : analyse du transcriptome sanguin dans un modèle ovin.

Posters

66th EAAP - 2015, Warsaw, Poland.

Bouvier-Muller J., Allain C., Enjalbert F., Tabouret G., Portes D., Caubet C., Tasca C., Foucras G. and Rupp R. Metabolic response to diet energy restriction in ewes selected for high and low mastitis resistance. ***Prix du meilleur Poster de la session Physiologie***

18ième Séminaire des thésards du département de génétique animale - 2016, La Rochelle, France.

Bouvier-Muller J., Rupp R. and Foucras G. Contribution of genetic background, energy status and their interaction on the immune responsiveness for resistance to mastitis

Journées d'animation scientifique du département Santé Animale - 2016, Futoroscope, France

Bouvier-Muller J., Allain C., Noirot C., Rupp R. et Foucras G. Conséquences d'une restriction énergétique sur la réponse à une épreuve inflammatoire mammaire

ADSA - 2017, Pittsburgh, Pennsylvania, United States.

Bouvier-Muller J., Rupp R. et Foucras G. Integration of phenotypic and transcriptomic data shows differences of metabolic response upon energy shortage in relation with genetic resistance to mastitis

1. Extraction des ARN

L'extraction des ARN peut être réalisée à l'aide de kits commerciaux type Nucleospin® RNA Blood. Cependant, il est important de procéder à la vérification de la pureté de l'ARN avant le séquençage. La pureté de l'ARN peut être mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre, un fluorimètre ou un Bioanalyzer. De plus, il est nécessaire de vérifier que la quantité d'ARN fourni est suffisante par mesure des absorbances à 260 et 280 nm, par fluorescence ou grâce à un analyseur dédié comme Agilent. Chacune de ces méthodes a ses points forts et faibles (Aranda IV et al. 2009). Le principe classique permettant de quantifier l'ARN est de mesurer l'absorbance de l'échantillon à 260 nm. En effet, la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques se situe à 260 nm alors que les protéines, principaux contaminants des solutions d'acides nucléiques, absorbent à 260 nm mais présentent un maximum d'absorption autour de 280 nm par les acides aminés aromatiques. La mesure du rapport de densité optique (DO) 260/280 permet donc de contrôler la pureté des échantillons d'ARN obtenus en évaluant la présence de contaminants dans l'échantillon. Un ARN pur obtiendra un rapport 260/280 supérieur ou égal à 2. Un rapport plus faible traduit généralement une contamination par des protéines.

La technologie Agilent® permet de déterminer précisément et rapidement la qualité et la quantité d'ARN à partir de faibles quantités d'échantillon (1 µL). L'apport majeur de cette technologie est le calcul automatique d'un score qualité appelé RIN (RNA Integrity Number) réalisé en utilisant le tracé électrophorétique de l'échantillon d'ARN. Sa valeur est comprise entre 1 et 10, un RIN de 10 correspondant à un ARN de qualité parfaite et un RIN de 1 correspondant à un ARN totalement dégradé.

2. Préparation des librairies pour le séquençage

a. Eliminer l'ARN contaminant

L'ARN total extrait en utilisant la procédure ci-dessus permet d'extraire en majorité de l'ARN ribosomal (>80%). La première étape consiste donc à sélectionner/enrichir les ARN messagers et donc éliminer l'ARN ribosomal. La principale méthode utilisée à ce jour est de sélectionner les ARN messagers matures par leur queue poly-A en utilisant un oligo-dT. Cette technique est utilisée par la plateforme Genotoul à l'aide de billes magnétiques poly-T.

L’inconvénient de cette approche est de diminuer les proportions des classes d’ARN ne possédant pas de queue poly-A.
Les ARNm sélectionnés par la queue poly-A sont donc matures. C'est un point important, car il se peut qu'un gène produise une grande quantité d'ARN, mais que ceux-ci soient rapidement dégradés avant leur maturation. Cette approche permet cependant de mieux révéler des trasncrits qui peuvent être traduits et avoir une fonction biologique.

b. Fragmentation

La majorité des plateformes de séquençage réalisent la fragmentation. L’objectif de cette étape est de fragmenter les ARNs sélectionnés en segments de 40 à 400 paires de bases selon la plateforme. Quatre différentes méthodes sont utilisées pour fragmenter l’ARN : enzymatique, chaleur, sonication et utilisation d’ions métalliques.
La majorité de ces méthodes utilisent l’ARN cependant très peu d’études comparant leur performance ont été réalisées. L’efficacité de la fragmentation peut être mesurée sur gel. La plateforme Genotoul fragmente les ARN en segments de 100 paires de bases grâce à une fragmentation enzymatique en tampon alcalin. Les fragments obtenus s’appelleront ensuite des reads. La longueur de ces reads est importante car elle joue un rôle essentiel pour l'étape suivante qui consiste à "mapper" (de se positionner dans le génome) ces derniers sur un génome de référence. Plus les reads seront petits, plus ils auront de chances (ou de risques) de mapper à plusieurs endroits du génome.

c. La transcription inverse

La majorité des premiers protocoles réalisait cette étape avant la fragmentation, cependant il est devenu de plus en plus courant de réaliser cette étape après la fragmentation. Cette étape permet de convertir l’ARN en un ADN double brin complémentaire (cDNA).L’enzyme transcriptase réverse (TR) est utilisée pour synthétiser un brin d’ADN en utilisant l’ARN comme modèle. La TR, comme d’autres polymérases nécessite un primer s’associant à l’ARN pour initier la polymérisation. Le second brin d’ADN est synthétisé par une ADN polymérase utilisant le brin d’ADN synthétisé par la TR comme modèle.

d. Mise en place des adaptateurs

La majorité des plateformes de séquençages procèdent à des amplifications clonales afin de créer un groupe (cluster=grappe) de molécules identiques, liées les unes aux autres sur un support solide.

Créer un cluster (donc amplifier l'ADNc) permet d'avoir plus de chance de le séquencer. Pour le séquençage avec une plateforme Illumina, les clusters sont créés après que le brin d'ADNc soit fixé sur la surface. Il est donc nécessaire d'ajouter une séquence qui va permettre la fixation de l'ADNc sur le support dans un premier temps, puis l'amplification clonale. De plus, il est nécessaire d'ajouter une séquence qui permettra l'initiation de la réaction de séquençage.

D'autres séquences peuvent également être ajoutées, comme des séquences « tag » permettant de multiplexer les échantillons. Le principe de multiplexage est de séquencer plusieurs échantillons en même temps. Pour cette méthode, il est nécessaire d'avoir une couverture suffisante du génome (au minimum 30X) et d'éviter de mettre tous les réplicats dans une même lane afin d'éviter la confusion d'effets. De plus, un séquençage à haut débit est capable de générer des millions de reads d'une séquence en une réaction. La technique étant coûteuse et longue, le multiplexage permet de séquencer des échantillons de différentes expériences en même temps. Les tags utilisés sont en général courts (5 à 7 paires de bases) et sont lus durant le séquençage permettant ainsi l'identification de l'échantillon.

Enfin, il est également possible d'ajouter des séquences aux deux extrémités du brin d'ADNc. Dans ce cas, il s'agit d'un séquençage « paired-end » durant lequel le séquençage est réalisé des deux côtés du read. Les séquençages « single-end » ont pour avantage d'être plus rapides et moins chers. Les séquençages paired end permettent d'assembler les gènes sur le génome de manière plus précise et exacte. Ils permettent d'obtenir deux fois plus d'informations que les séquençages « single-end ». L'addition des adaptateurs peut se faire par différentes méthodes. La méthode par PCR (« Polymerase Chain Reaction ») est la plus utilisée et a été initialement développée pour le séquençage d'ADN. Une fois que l'ARN est converti en ADNc double brin, les extrémités sont réparées afin d'avoir des bouts francs à l'aide d'une exonucléase et une extrémité d'adénosine est ajoutée. Les fragments sont ensuite purifiés sur gel.

e. Librairies orientées

La majorité des protocoles pour la création de librairies synthétisent des ADNc double brin à partir des ARN, puis ajoutent les adaptateurs. Cependant, l'addition d'adaptateurs lors de la PCR avec « adaptateurs Y » permet la création de molécules asymétriques. Les librairies contiennent ainsi en réalité deux populations de molécules ; une population d'ARN dont le sens de séquençage (donné par les adaptateurs) correspond au sens du brin sen de l'ADN, et une population dont le sens correspond au brin dit « anti-sens » de l'ADN.

Le sens du brin d'ARN original est donc perdu lors de cette étape, ce qui pose problème dans l'assemblage des reads. Afin de pallier ce problème, des protocoles de création de librairies prenant compte du sens de l'ARN ont été développés (Levin et al. 2010). La principale approche de ces protocoles consiste à utiliser la DNA polymérase de E. Coli qui est capable d'intégrer indifféremment des nucléotides dUTP ou du dTTP dans le brin d'ARN. Cette polymérase est ainsi utiliser pour la création et le marquage du second brin après l'étape de transcription réverse. Les adaptateurs-Y sont ensuite fixés de manière identique pour les brins « sens » et les brins « antisens ». Il est ensuite possible d'amplifier uniquement les brins « sens » qui ne contiennent pas d'UTP.

f. Validation et quantification

Afin d'obtenir des données de séquençage de qualité, il est important de vérifier la qualité et la quantité des librairies. Les méthodes basées sur l'absorbance présentent certains inconvénients dus aux mesures des primers résiduels et des dNTPS. Les méthodes basées sur la fluorescence sont en général assez sensibles aux ARN mais peu sensibles aux contaminants c'est pourquoi elles ne seront pas privilégiées non plus. Les méthodes les plus robustes (et employées par la plateforme Genotoul) consistent à faire des quantifications par PCR quantitative et estimer la concentration des fragments à l'aide de manière électrophorétique à l'aide de Bioanalyser.

3. Le séquençage

Les trois technologies les plus répandues dans les années 2000 étaient : Life Technologies (SOLiD v4), Illumina (HiSeq 2000) et Roche 454 (GS FLX Titanium) (Borgström et al., 2011) ; (Suzuki et al., 2011).

Caractéristiques	**Life Technologies (SOLiD v4)**	**Illumina (HiSeq 2000)**	**Roche 454 (GS FLX Titanium)**
Support	Billes + Lame	Lame	Billes + Plaque de pico-titration
Technique d'amplification	Emulsion PCR	Par pontage sur phase solide	Emulsion PCR
Longueur des lectures (en nucléotide par fragment)	50 + 35	2 x 100	400 x 2
Nombre de reads	0.7 x 109	3 x 109	0.5 x 109
Temps de séquençage /échantillon	7 jours	8.5 jours	10 heures

Le modèle GS FLX Titanium de Roche permet de séquencer des fragments d'ADN longs, de 400 nucléotides, alors que les autres technologies séquencent des fragments courts de 50 à 100 nucléotides. Cette technologie est donc largement utilisée pour le séquençage de-novo des génomes de grande taille. La longueur de ces reads permet un assemblage plus facile du génome d'intérêt bien que la couverture obtenue reste relativement faible.
En revanche, les séquenceurs Illumina et SOLiDTM génèrent des reads de courte taille en très grand nombre. Cette particularité est très utile pour les analyses nécessitant une plus grande couverture telles que l'étude quantitative du transcriptome, la détection spécifique de polymorphismes ou des marques épigénétiques.

Principe de la chimie du HiSeq2000 d'Illumina

La technologie « True-Seq » commercialisée par la société Illumina repose sur l'utilisation d'une lame de verre divisée en 8 pistes linéaires dans lesquelles sont fixées, à haute densité, deux courtes séquences d'ADN de manière aléatoire. Ces deux séquences correspondent aux séquences complémentaires des adaptateurs. À la différence des deux autres technologies qui ont recours à l'amplification par émulsion PCR couplée à l'utilisation de billes magnétiques, les fragments d'ADN possédant les deux adaptateurs vont s'hybrider à la lame de manière homogène. L'amplification est ensuite obtenue à l'aide d'amorces spécifiques des adaptateurs. Cette amplification permet la constitution par pontage d'un groupe (« cluster ») de séquences amplifiées. Le séquençage par synthèse (« Sequencage By Synthesis » ou SBS) de ces clusters va permettre la lecture de l'incorporation d'un fluorochrome spécifique d'une base à chaque ligation, par la prise d'une image à très haute résolution de la lame. Après repérage des coordonnées des clusters, il est possible de reconstituer les séquences ADN pour chacun d'entre eux.

Principe de la chimie du GS FLX Titanium de Roche

La technique commercialisée par la société Roche est basée sur l'amplification par PCR en émulsion de l'ADN fixé sur des billes, suivie de pyroséquençage dans une plaque de pico-titration permettant une lecture en parallèle des millions de fragments d'ADN à séquencer. Les librairies, constituées de fragments d'ADN simple brin auxquels sont fixés les adaptateurs, sont mises en présence de billes magnétiques sur lesquelles sont fixés des milliers de copies de la séquence complémentaire de l'adaptateur.

Une émulsion en concentration limitante d'ADN permet de fixer un seul fragment d'ADN par bille qui sera par la suite amplifié par PCR.

Une fois les fragments présents en de multiples copies monoclonales sur les billes, celles-ci sont placées dans des mini-réacteurs, des plaques de pico-titration. Ces plaques permettent une lecture indépendante de chaque bille, donc de chaque séquence par pyroséquençage (Rougemont et al., 2008). Lors du pyroséquençage, les nucléotides sont rajoutés successivement contrairement aux réactions de séquençage usuelles où les nucléotides sont rajoutés simultanément, chacun étant marqué à l'aide d'un fluorochrome différent. Si le nucléotide présent dans le milieu réactionnel est celui attendu par l'ADN polymérase, il est incorporé dans le brin d'ADN en cours de synthèse libérant ainsi un pyrophosphate (PPi). Ce PPi permet la transformation de l'adénosine 5'phosphosulfate (APS) en ATP par l'ATP sulfurylase. Cette molécule d'ATP va se coupler à la luciférine pour permettre à la luciférase de transformer la luciférine en oxyluciférine. Cette dernière réaction émet un signal lumineux qui va être capté par le scanner du séquenceur. Les nucléotides en surplus dans le milieu réactionnel sont alors dégradés par une apyrase ce qui permet la lecture de la base suivante.

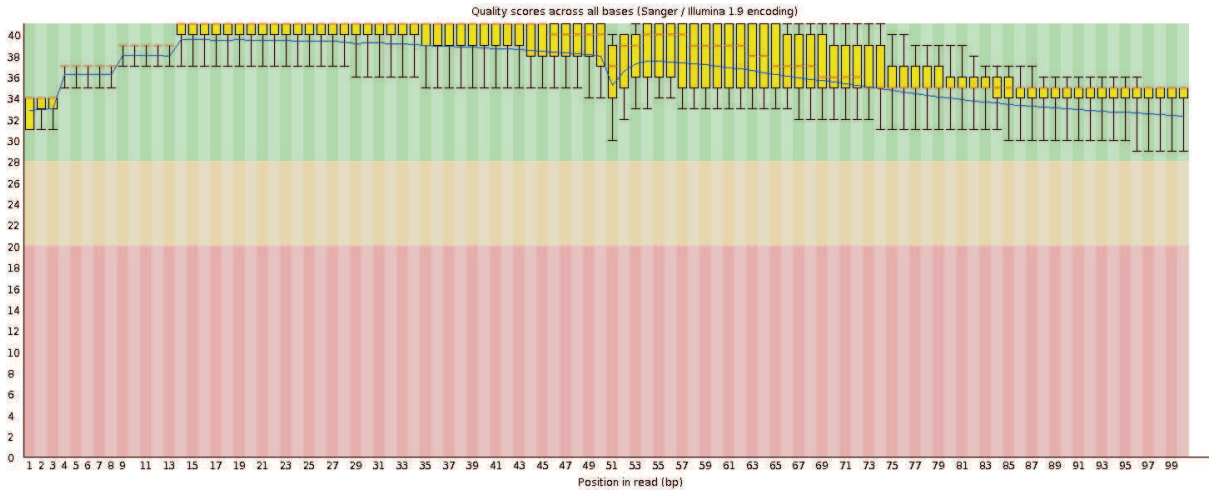
4. Le contrôle qualité des fichiers

La plateforme de séquençage fournit ensuite les résultats sous forme de fichiers fastq qui sont des fichiers texte permettant de stocker à la fois des séquences biologiques mais aussi leur score de qualité associé. Certains tutoriels, comme ceux présentés dans les liens ci-dessous permettent de mieux comprendre l'analyse qualité mise à disposition par la plateforme de séquençage :

http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/Help/3%20Analysis%20Modules/
https://www.youtube.com/watch?v=bz93ReOv87Y&list=PLsKRuqwh81JYeGX6oQ3cfaEhkn0gQxQMf

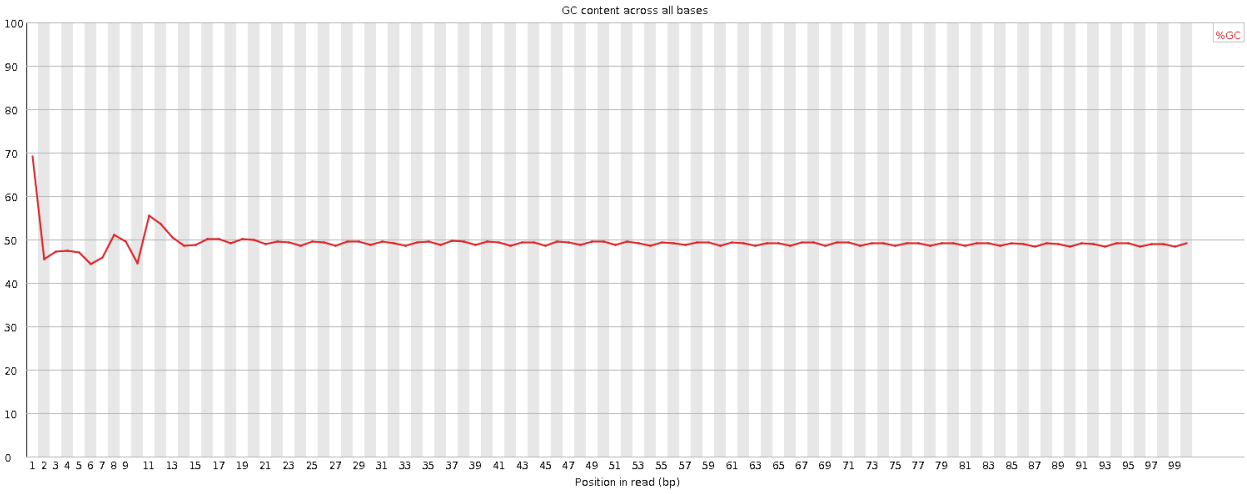
a. Qualité des reads par position

Ce graphe permet de visualiser la qualité de la lecture des nucléotides sur le read. Plus le score est important, meilleure est la qualité de lecture. Les scores de bonne qualité se trouvent dans la partie verte du graphe, ceux de qualité médiocre dans la partie orange et les scores de mauvaise qualité dans la partie rouge. Les données sont représentées par des boites à moustaches jaunes et la moyenne du score par la ligne bleue.



b. Pourcentage de base GC par position

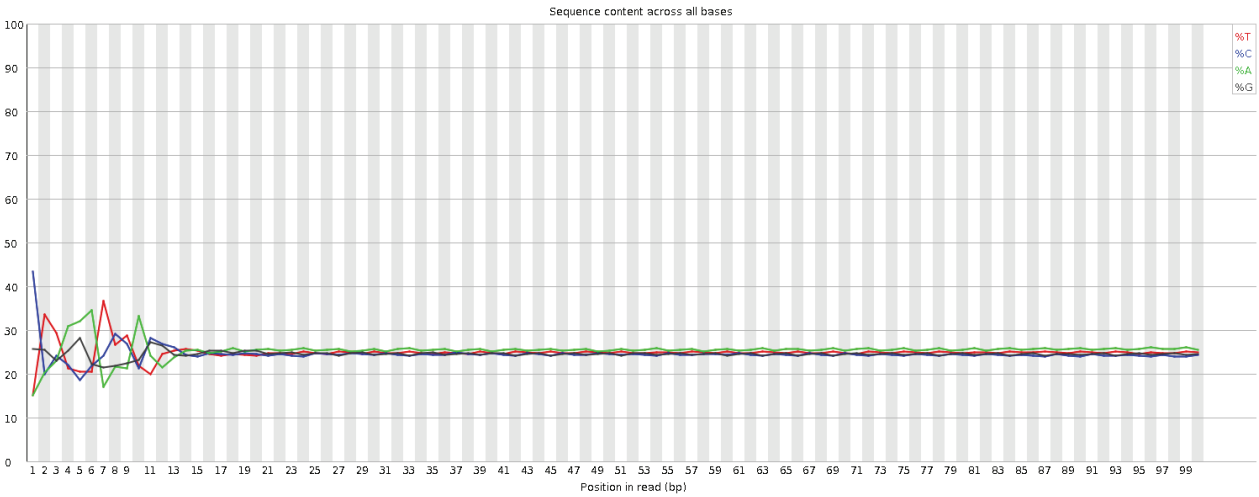
Le pourcentage de base GC par position dans le read permet également de qualifier la qualité du read. En effet, sur un read de bonne qualité, le pourcentage de base GC se trouve à environ 50%.



Il arrive fréquemment que ce pourcentage varie de manière importante sur les 15 premières bases, ce qui peut être dû à une sélection biaisée des primers, des inserts trop petits ou la mauvaise réception du laser.

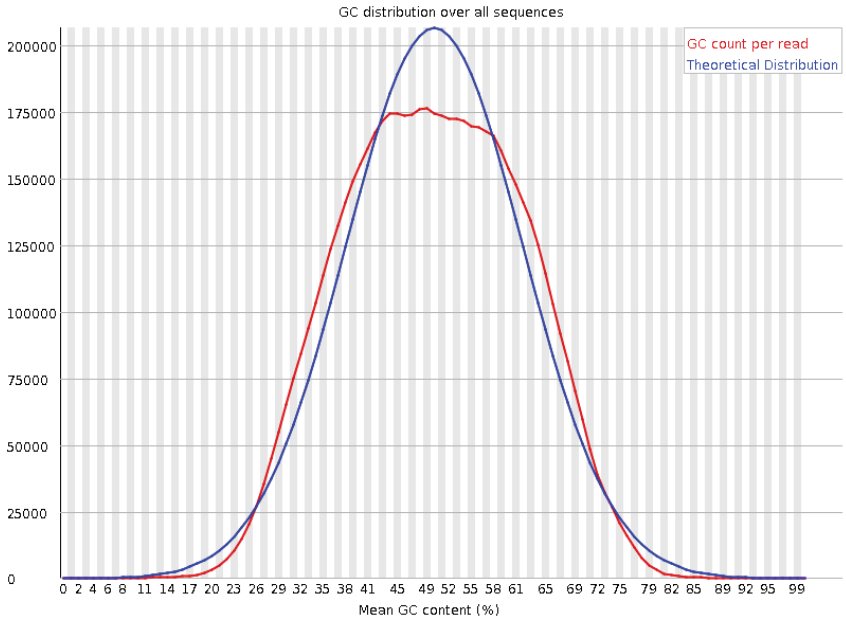
c. Pourcentage de base ACGT par position

Comme pour le GC%, on observe fréquemment des variations fortes sur les 15 premières bases. Des pourcentages moyens de 25% de chaque base tout au long de la séquence traduisent une bonne qualité de séquençage.



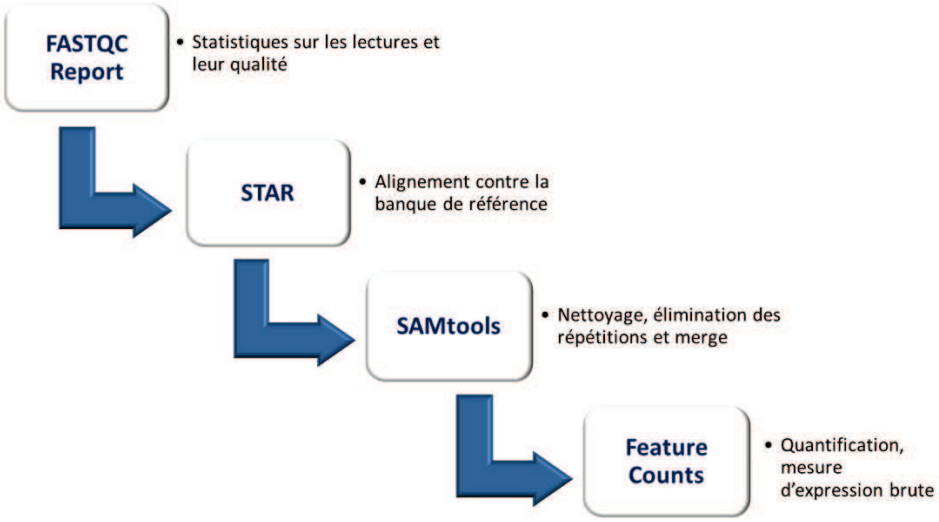
d. Pourcentage de base GC pour la séquence complète

Ce graphe représente la distribution des bases GC sur l'ensemble des séquences (en rouge) et la compare à une distribution normale (en bleue). Une distribution anormale des bases, décalée par rapport à la distribution normale par exemple, pourrait suggérer une éventuelle contamination de l'échantillon.



5. Les traitements bioinformatiques

Divers traitements bioinformatiques sont ensuite nécessaires pour obtenir un fichier de comptage représentant l'expression des gènes par échantillon. Le graphe ci-dessous permet de représenter les traitements réalisés au cours de cette thèse.



Le choix des logiciels informatiques utilisés est présenté dans la discussion générale de cette thèse. Il est important de préciser qu'il est également possible de travailler à partir d'un génome *de novo*. Ce génome regroupe les gènes du génome classique Ensembl, mais également les gènes que le mapping n'a pas permis d'identifier. Dans cette thèse, toutes les analyses ont été réalisées à partir du génome classique Ensembl. En effet, les essais sur le génome *de novo* ont entrainé une perte importante de puissance statistique. Le fichier de comptage comportait en effet près de 250000 gènes, soit dix fois plus que le fichier de comptage généré à partir du génome Ensembl classique, ce qui est probablement dû au choix des traitements bioinformatiques pour obtenir le génome *de novo*.
Les lignes de commande utilisées sont présentées ci-dessous :

a. Etape de concaténage

Lors de ce séquençage, trois runs ont été réalisés par échantillon, pour avoir une bonne profondeur de séquençage. De plus, le séquençage était paired-end, il y avait donc deux lectures de chaque read (une par extrémité). Chaque échantillon avait donc 3 runs * 2 reads fichiers fastq. La première étape consistait donc à concaténer les fichiers des 3 runs dans un seul fichier.

Ligne de commande:

```
find . -name "*.fastq.gz" | grep RawData | perl -ne 'chomp; ($ech,$r)=$_=~/.*\/(\d+).*_(R\d).fastq.gz/; print "$ech $r $_\n"' | sort > ech.txt
cut -d " " -f3 ech.txt | paste - - - | sed "s/\t/ /g" | perl –ne 'chomp;($ech,$r)=$_=~/.*\/(\d+).*_(R\d).fastq.gz/ ; print "zcat $_ | gzip > $ech.$r.fastq.gz\n" ' > cmd_zip
qsub -q unlimitq cmd_zip
```

Options:
zcat: permet de concaténer des fichiers sans les décompresser

b. Création d'un index STAR à partir du génome Ensembl

Il est ensuite nécessaire de créer un index STAR à partir du génome Ensembl de référence (ici le génome ovin).

Ligne de commande:
mkdir -p /home/jbouvier/work/Project_RUMOFLAME.447/reference/index
cat > generate_index.cmd<<eof
/usr/local/bioinfo/src/STAR/STAR-STAR_2.4.0i/bin/Linux_x86_64/STAR --runMode genomeGenerate --genomeDir ~/work/Project_RUMOFLAME.447/reference/index --genomeFastaFiles ~/work/Project_RUMOFLAME.447/reference/Ovis_aries.Oar_v3.1.dna.toplevel.fa --sjdbGTFfile /work2/bank/ebi/ensembl/ovis_aries_genome/ensembl_ovis_aries_genome_2015-02-18/flat/current_gtf/ovis_aries/Ovis_aries.Oar_v3.1.79.gtf --runThreadN 16 --sjdbOverhang 99
eof
qsub -q unlimitq -pe parallel_smp 16 generate_index.cmd

Options:
--*runMode genomeGenerate* : création d'un index
--*genomeDir* : pathway de l'index à créer
--*sjdbGTFfile* : permet de spécifier le GTF
--*runThreadN 16* : nombre de threads utilisés durant l'analyse

c. Mapping STAR

Le mapping est ensuite réalisé avec STAR. Il génère un fichier .bam à partir des deux fichiers fastq (un pour chaque read) fourni.

Ligne de commande:
*ls *_R1.fastq.gz | perl -ne 'chomp; ($ech)=$_=~/(.*)_R1/; print "/usr/local/bioinfo/src/STAR/STAR-STAR_2.4.0i/bin/Linux_x86_64/STAR --genomeDir /work/jbouvier/Project_RUMOFLAME.447/reference/index --outStd SAM -- readFilesIn $_ ".$ech."_R2.fastq.gz --alignIntronMin 10 --alignIntronMax 25000 --outFilterMismatchNmax 10 --readFilesCommand zcat | samtools view -bS -\@4 - > $ech.bam \n "' > star_cmds*
qsub -pe parallel_smp 8 -l mem=10G star_cmds

Options:
--*genomeDir* : lien vers l'index star créé précédemment
--outStd SAM: fichier sortant dit être en format SAM
–*readFilesIn* : Indication des fichiers entrants
--*alignIntronMin 10* : taille minimum d'introns est de 10 (en dessous, c'est considéré comme une délétion)
--*alignIntronMax 25000* : taille maximum d'introns est de 25000
--*outFilterMismatchNmax 10* : nombre de nucléotides maximum différant entre le transcrit et le gène
--*readFilesCommand* zcat: il faut lui indiquer que les fichiers rentrant sont en .zc

d. Tri et réorganisation des fichiers à l'aide Samtools sort

Cette étape permet de réorganiser les reads en fonction de leur position et du chromosome. L'utilisation de samtools flagstat montre que le nombre de read ne varie pas. En revanche, le fichier est moins lourd.

Ligne de commande:
*ls *.bam | perl -ne 'chomp ; print "/usr/local/bioinfo/src/samtools/samtools-0.1.19/samtools sort $_ $_.sort.bam \n " ' > sort.cmd*
qsub -q unlimitq sort2.cmd
qsub -q hypermemq sort.cmd
(renommage des fichiers)
*ls *.bam.bam | perl -ne 'chomp; ($ech)=$_=~/(\d+)\..*/; print "mv $_ ".$ech."_sort.bam\n"'*

*ls *.bam.bam | perl -ne 'chomp; ($ech)=$_=~/(\d+)\..*/; system "mv $_ ".$ech."_sort.bam\n"'*

e. Vérification des fichiers à l'aide de Samtools flagstat

Cette ligne de commande permet d'obtenir le nombre de read 1, de read 2 et de reads totaux pour un échantillon.

Ligne de commande:

*ls *.bam | perl -ne 'chomp ; print "/usr/local/bioinfo/src/samtools/samtools-0.1.19/samtools flagstat $_ \n " ' > flagstat.cmd*
qsub -q hypermemq flagstat.cmd

f. Comptage sur le génome ENSEMBL avec Features Counts

Ligne de commande:

cat>feature3.cmd<<eof
*featureCounts -s 2 --primary -p -P -C -t exon -g gene_id -a /work2/bank/ebi/ensembl/ovis_aries_genome/ensembl_ovis_aries_genome_2015-02-18/flat/current_gtf/ovis_aries/Ovis_aries.Oar_v3.1.79.gtf -o countspPC1.txt *_rmdup_sort.bam*
eof
qsub -q hypermemq feature3.cmd

Options :

-s 2 : Indicate if strand-specific read counting should be performed.: 0 (unstranded), 1 (stranded) and 2 (reversely stranded). 0 by default.
--primary: If specified, only primary alignments will be counted. Primary and secondary alignments are identified using bit 0x100 in the Flag field of SAM/BAM files.
-p : If specified, fragments (or templates) will be counted instead of reads. This option is only applicable for paired-end reads. The two reads from the same fragment must be adjacent to each other in the provided SAM/BAM file.
-P : If specified, paired-end distance will be checked when assigning fragments to meta-features or features. This option is only applicable when -p is specified. The distance thresholds should be specified using -d and -D options.
-C : If specified, the chimeric fragments (those fragments that have their two ends aligned to different chromosomes) will NOT be included for summarization. This option is only applicable for paired-end read data.
-a : Give the name of the annotation file
-o : Give the name of the output file

Juliette BOUVIER-MULLER

TITLE: A study of the interactions between energy status and predisposition to mastitis during early lactation

ABSTRACT:

Intramammary infections and mastitis are a leading cause of diseases, death and production losses in dairy ruminants. Increased susceptibility to mastitis during the peripartal period has been yet widely documented. Negative energy balance is frequent in early lactation and considered as a known risk factor for mastitis. The relationship between energy balance and mastitis susceptibility however remained unclear and poorly described. The aim of my thesis was to examine the relation between a negative energy balance and susceptibility to mastitis in dairy ewes. In particular, my research works showed an enhanced susceptibility to energy restriction in mastitis-susceptible ewes.

--

KEYWORDS:
Mastitis, Negative Energy Balance, RNA-seq, Data integration

AUTEUR : Juliette BOUVIER-MULLER

--

DIRECTEURS DE THESE : Gilles FOUCRAS et Rachel RUPP

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toulouse, le 15 septembre 2017

TITRE : Etude des interactions entre le statut énergétique et la prédisposition aux mammites en début de lactation

RESUME :
Les infections intra-mammaires (IMI) responsables de mammites, sont une cause importante de maladie, de mortalité et de pertes de production chez les ruminants laitiers. Le péri-partum est une période où la fréquence des mammites est significativement plus élevée. Parmi les facteurs de risques, le déficit énergétique, fréquent au début de la lactation, est souvent évoqué. Cependant, les bases mécanistiques de l'éventuelle relation entre IMIs et déficit énergétique sont encore peu comprises.

L'objectif de ma thèse était ainsi d'évaluer la relation éventuelle entre le déficit énergétique et la prédisposition aux mammites en utilisant la brebis laitière comme modèle. Mes travaux ont montré que les brebis génétiquement prédisposées aux mammites ont également une sensibilité accrue au déficit énergétique et à la cétose.

--

MOTS-CLES :
Mammites, Bilan Energétique Négatif, RNA-seq, Intégration de données

---

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

GenPhySE
24 chemin de Borde-Rouge,
31326 Castanet Tolosan,
France