

Sélection divergente sur la résistance aux mammites en races Holstein et Normande : comparaison des réponses génétique et immunitaire entre lignées

LEFEBVRE R. (1), BARBEY S. (2), LAUNAY F. (2), RAINARD P. (3), FOUCRAS G. (4), BOICHARD D. (1), GERMON P. (3)

(1) Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350, Jouy-en-Josas, France

(2) INRAE UE326 Domaine Expérimental du Pin, 61310 Gouffern en Auge, France

(3) ISP, INRAE, UMR 1282, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

(4) IHAP, Université de Toulouse, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT), INRAE, F-31076 Toulouse, France

RESUME - Les mammites sont un problème majeur en élevage bovin. Bien que les effets environnementaux soient prépondérants sur cette infection, la variabilité génétique de la résistance aux mammites est importante. Une expérimentation de sélection divergente sur la résistance aux mammites a été conduite au domaine expérimental du Pin (INRAE) en races Holstein et Normande. Elle a permis de procréer des femelles de lignées « résistante » (RES) et « contrôle » (CTL), sur la base des valeurs génétiques de leurs pères. Les objectifs de cette expérimentation étaient d'évaluer l'efficacité de la sélection génomique, de mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués et les effets de régions chromosomiques connues (QTL), de rechercher des prédicteurs indirects et précoces et de déterminer quelles relations existent avec d'autres caractères. 209 vaches RES et 153 CTL ont été comparées sur 2 lactations. Les différences observées entre lignées sur les scores cellulaires (-0,7 point), les mammites cliniques (-10% de vaches atteintes en première lactation), le statut infectieux de la mamelle au cours de la lactation (-13% d'échantillons positifs à un test bactériologique par PCR), en faveur des lignées résistantes, sont en accord avec les prédictions génomiques. Les différences intra race sont similaires, avec des résultats plus marqués et toujours significatifs en race Holstein.

La séquence complète de chaque vache a été prédite à partir de leur génotypage et des séquences d'individus de la même race. En race Holstein, les fréquences des 26 millions de variants de la séquence ont été calculées pour chaque lignée et comparées entre lignées pour identifier des régions potentiellement impactées par la sélection. 236 régions significativement différentes entre lignées ont été identifiées avec 39% de ces régions comprises dans un QTL utilisé dans l'évaluation génomique des cellules ou des mammites cliniques. La région avec la différence de fréquence la plus forte entre lignées (12.2%) est située sur le chromosome 7 à 52.2 Mb. Elle contient 3 gènes non décrits actuellement et n'est pas incluse dans un QTL connu.

Pour caractériser les mécanismes de résistance génétique aux mammites, les vaches ont été soumises à un challenge intra mammaire avec du lipopolysaccharide (LPS). L'inflammation a été suivie par comptages cellulaires et dosages de cytokines/chimiokines (IL-6, IL1- β , IL-8) dans le lait. Bien que le LPS a déclenché une inflammation dans tous les quartiers infusés, les vaches « résistantes » ont montré une plus faible réponse à 8h post injection comparé aux vaches « contrôle ». Des analyses sont en cours pour déterminer si ces différences sont associées à des variants situés dans des gènes de réponse LPS et plus largement dans des gènes impliqués dans les voies immunitaires.

Selection on mastitis resistance in Holstein and Normande breeds: genetic and immune responses

LEFEBVRE R. (1), BARBEY S. (2), LAUNAY F. (2), RAINARD P. (3), FOUCRAS G. (4), BOICHARD D. (1), GERMON P. (3)

(1) Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350, Jouy-en-Josas, France

SUMMARY - Mastitis is a major issue in dairy cows. Although environmental effects are preponderant, the genetic variability of mastitis resistance is important. A divergent genetic selection experiment on mastitis resistance was carried out at Le Pin INRAE experimental farm in Holstein and Normande breeds, yielding females of resistant and control lines, based on their sire breeding values. The aims of this experiment were to evaluate the efficiency of genomic selection on this trait and to better understand the immune background and the relations with other traits. Based on data of 362 cows, overall differences between lines for cell scores (-0.7 point), clinical mastitis (-10% affected cows) and udder infection status (-13% positive to a bacteriological test) were favourable to resistant cows, in agreement with genomic predictions. Within-breed differences were similar, with clearer and always significant results in Holstein breed. The whole genome sequence of each cow was imputed from her SNP genotype. In Holstein breed, variant frequencies were calculated for each line and then compared between lines to identify regions impacted by selection. 236 regions significantly different between lines were identified. 39% of these regions are included in QTLs currently used in the French genomic evaluation of clinical mastitis or cell counts. To characterize mechanisms underlying genetic resistance to mastitis, cows were submitted to an intra mammary challenge with lipopolysaccharide (LPS). Inflammation was monitored by cell count and cytokines/chimiokines (IL-6, IL1- β , IL-8) assays in milk. Even though LPS triggered an inflammation in every infused quarter, resistant cows showed a weaker response at 8h post injection compared to control cows. Analyses are on-going to determine if these differences are associated with variants located in LPS response genes, and more widely in genes implicated in immunity pathways.

INTRODUCTION

En élevage laitier, les mammites restent un problème sanitaire et économique majeur, avec une incidence moyenne de 40% de vaches atteintes (Fourichon *et al.*, 2001). Bien que les effets environnementaux soient prépondérants sur ce caractère, sa variabilité génétique est importante. La sélection génomique sur la résistance aux mammites est donc un levier pour réduire cette incidence. Depuis 2012 l'index « Santé de la mamelle » est disponible en France et intégré dans les objectifs de sélection des races laitières. Il combine les index de score cellulaire somatique (SCS) et de mammites cliniques (MC) en s'appuyant sur la forte corrélation génétique existant entre ces deux caractères : 0,59 en race Normande et 0,70 en race Holstein (Govignon-Gion *et al.*, 2016). Cependant les mécanismes biologiques impliqués dans les différences génétiques restent peu connus. La capacité d'une vache à déclencher son système immunitaire rapidement et efficacement lors d'une infection est une voie à explorer pour expliquer la résistance aux mammites.

Pour répondre à ces questions, une sélection divergente sur la résistance aux mammites a été conduite au domaine expérimental du Pin (INRAE) en races Holstein et Normande. A l'échelle des populations, il s'agit de vérifier l'efficacité de la sélection et l'améliorer grâce à la détection de nouvelles régions génomiques ayant un effet sur la résistance aux mammites. À l'échelle de la vache, il s'agit de rechercher des prédictors indirects (précoces et accessibles) de l'infection, autre que le comptage des cellules somatiques du lait individuel, et d'étudier le niveau de réponse inflammatoire, c'est-à-dire la cinétique de recrutement des cellules immunitaires dans le lait et la caractérisation des cellules.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. ANIMAUX ET SELECTION DIVERGENTE

La divergence génétique sur la résistance aux mammites a été induite en créant deux lignées à partir de taureaux d'insémination. L'index « Santé de la mamelle » n'étant pas disponible au moment des procréations, ils ont été choisis sur leurs index SCS et MC et classés en deux catégories : RES (résistant) si la moyenne des deux index ≥ 1 (i.e. -0.5 point de SCS et -4.5% d'incidence de MC attendus par rapport à la moyenne) et CTL (contrôle) si $-1,5 \leq \text{moyenne} \leq -0,5$ (i.e. au moins +0.25 point de SCS et +2.25% d'incidence de MC attendus par rapport à la moyenne). Une première génération de femelles non sélectionnées a été inséminée avec les taureaux choisis (43 Holsteins et 30 Normands), puis leurs filles ont été inséminées avec des taureaux appartenant à la même lignée que leur père afin d'augmenter la divergence en deuxième génération. Toutes les femelles ont été génotypées avec la puce EuroG10k (Illumina Inc., San Diego, CA) et disposent de prédictions génomiques issues de l'évaluation nationale. Ainsi elles sont classées suivant deux typologies basées sur: (i) la lignée paternelle (RES ou CTL); (ii) leur propre prédiction génomique (GRES ou gCTL) qui est plus précise. Le protocole s'est déroulé de 2012 à 2019 et inclut 362 vaches (215 Holstein et 147 Normande) avec une première lactation, dont 248 ont une seconde lactation (Tableau 1).

1.2. MESURES EXPERIMENTALES

Toutes les vaches ont été conduites ensemble et phénotypées de la même façon sur les deux premières lactations: production laitière et poids corporel à chaque traite, composition du lait bihebdomadaire, spectre MIR

Tableau 1 : Effectifs de vaches par race, lignée et lactation

Lactation	Holstein		Normande	
	RES	CTL	RES	CTL
L1	135	80	74	73
L2	96	48	54	50

hebdomadaire, NEC mensuelle, pointage morphologique, dosage de progestérone hebdomadaire, dosage métabolique 3 fois dans la lactation et description de chaque mammité. En première lactation, une identification bactériologique par PCR (PathoProof Mastitis PCR Assay, Finnzymes Oy, Finlande) dans le lait a été réalisée 3 fois dans la lactation et à chaque MC. La ration alimentaire est restée constante tout au long du protocole, avec pâturage entre avril et octobre.

Pour les analyses, les valeurs de comptages cellulaires (réalisés par le laboratoire de contrôle laitier Lilano) ont été transformées en SCS par la formule $\log_2(\text{CCS}/100\,000)+3$.

Une MC a été incluse dans l'étude si observée avant 150 jours de lactation et dans un délai minimum de 7 jours après la précédente. Ainsi 230 ont été retenues en L1 et 163 MC en L2 afin de calculer l'incidence de MC par lignée et le nombre de MC par vache.

Une bactériologie a été considérée positive si au moins un des pathogènes recherché a été détecté ($\text{Ct} < 37$ pour les pathogènes majeurs, < 32 pour les mineurs). Les échantillons présentant plus de trois pathogènes détectés ont été exclus car considérés comme contaminés.

Quarante-neuf vaches (22 RES et 27 CTL) ont été retenues pour l'étude de la réponse inflammatoire lors de leur deuxième ou troisième lactation, afin de ne pas impacter l'effet de la sélection au début de leur vie productive. Pour les épreuves inflammatoires, les quartiers ont été sélectionnés sur la base d'une absence de bactéries dans le lait 24h avant injection et d'un comptage cellulaire inférieur à 10 000 cellules par ml de lait la semaine précédant l'épreuve. Cinq semaines post-vélage (+/- 7 jours), un seul quartier par vache a été injecté avec 10 microgrammes de LPS ultrapure Vaccigrade (Invivogen) resuspendu dans 2 ml de PBS – 0,5 % BSA. L'injection de LPS a eu lieu après la traite du matin. Un échantillon de lait de 10 ml a été collecté 4h et 8h après injection puis au cours des traites complètes à 12h, 24h, 48h et 72h post-injection. Le comptage des cellules somatiques du lait (CCS) a été réalisé à l'aide d'un appareil (Fossomatic model90; Foss Food Technology, Hillerød, Denmark) et a été transformé en SCS. Les cytokines IL-6 et IL-1 β ont été dosées par ELISA (Thermo Fisher).

Le protocole expérimental d'épreuve inflammatoire a été conduit en accord avec la réglementation européenne 2010/63/UE. Il a été évalué par le comité d'éthique N°007 et a reçu l'autorisation APAFIS#3067-20 16021518576270 v1.

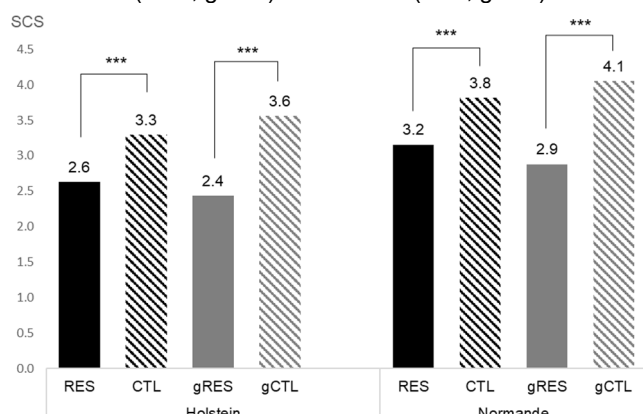
1.3. ANALYSES STATISTIQUES

La comparaison des performances de production a été réalisée dans un modèle de régression linéaire incluant campagne, mois de vélage et âge au vélage comme effets fixes ainsi que la lignée (procédure GLM du logiciel SAS).

En race Holstein, la séquence complète de chaque vache a été prédite (logiciel Minimac) à partir de leur génotypage et des séquences d'individus de la même race (issues du projet international « 1000 Bull Genomes », assemblage ARS-UCD1.2.). Les fréquences alléliques des 26 millions de variants de la séquence ont été calculées dans chacune des deux lignées RES et CTL. Les différences de fréquence entre lignées (en %) ont été moyennées par région de 100 kb pour identifier des régions possiblement impactées par la sélection. Afin de ne pas prendre en compte les différences de fréquence non liées à la sélection sur la résistance aux mammites, des seuils de significativité à 1% ou 1‰ ont été définis. Pour cela, 1000 jeux de données ont été simulés en attribuant aléatoirement une lignée aux mêmes génotypes. Les seuils retenus correspondent au 1% ou 1‰ des différences maximales de fréquences observées dans ces simulations, soit 6 et 9% de différence respectivement.

La comparaison des comptages cellulaires et des quantités de molécules de l'inflammation produites lors de l'épreuve LPS a été réalisée par un test de Wilcoxon (package R stats v3.6.2).

Figure 1 : Moyenne de SCS (L1 et L2 confondues) des vaches résistantes (RES, gRES) et contrôles (CTL, gCTL)



2. RESULTATS

2.1. REPONSES ZOOTECHNIQUES

Concernant la production de lait sur 305 jours, aucune différence significative n'a été observée entre lignées intra race (7747 kg en Holstein et 4900 kg en Normande), en accord avec la sélection pratiquée.

Les vaches des lignées RES présentent un SCS moyen significativement plus faible que les vaches CTL dans les deux races et pour les deux lactations (-0,7, $p < 0,0001$, Figure 1).

L'effet est encore plus prononcé en considérant les groupes génomiques avec -1,2 et -1,3 point de SCS chez les vaches Holstein et Normande gRES, respectivement (Figure 1).

En L1, 32% des vaches RES ont eu au moins 1 MC contre 42% des vaches CTL. Cependant la sélection a eu un effet opposé intra races: les vaches Holstein RES ont montré l'effet attendu avec -23% de vaches affectées ($p = 0,001$) contre +5% de Normandes RES affectées ($p = 0,025$) (Tableau 2). Lorsque l'on considère les groupes génomiques, le sens attendu est bien observé avec -40% ($p < 0,0001$) et -12% (0,1879) de vaches gRES affectées en Holstein et Normande respectivement. En L2, l'effet attendu est aussi retrouvé dans les deux races avec des vaches résistantes moins affectées (-24% et -49% pour RES et gRES respectivement, $p < 0,0001$). La différence du nombre de MC par vache en L1 est en faveur des vaches RES avec -0,6 MC chez les Holstein (1,6 vs 2,1, $p < 0,0001$) et -0,2 MC chez les Normandes (1,5 vs 1,7, NS). Dans les groupes génomiques on observe la même tendance avec -0,45 MC en Holstein ($p = 0,0031$) et -0,8 en Normande ($p = 0,022$). En L2, aussi bien pour les lignées que pour les groupes génomiques, le nombre de MC était moins important chez les vaches Holstein résistantes (-0,7, $p = 0,015$) mais pas chez les vaches Normandes résistantes (+0,16, NS).

Aucune différence du nombre de quartiers atteints n'a été observée entre lignées avec 97% des MC n'en affectant qu'un. Concernant les bactériologies par PCR, tous les échantillons de lait prélevés lors de mammites cliniques étaient positifs pour au moins 1 pathogène, avec 87,2% des cas liés à *Streptococcus uberis* et 10,3% à *Escherichia coli*.

Concernant les bactériologies destinées à déterminer le statut infectieux de la mamelle au cours de la lactation, dans les deux lignées et les deux races, le taux d'échantillons positifs a diminué avec le stade de lactation avec en moyenne 36, 26 et 20% à 1, 4 et 7 mois de lactation respectivement.

Tableau 2 : Différences d'incidence de MC (en %) entre les lignées résistantes (RES, gRES) et contrôle (CTL, gCTL)

		RES	CTL	p-value	gRES	gCTL	p-value
Holstein	L1	28.1	51.3	0,001	17.5	58	<0,0001
	L2	30.9	52.1	0,0003	17.8	65	<0,0001
Normande	L1	37.8	32.9	0.02	27	39.1	0.19
	L2	27.8	56	<0,0001	25	76.7	<0,0001

Les pathogènes majoritaires détectés étaient : *Staphylococcus spp* dans 45,6% des cas, *Streptococcus uberis* dans 43,4% et *Escherichia coli* dans 17,3%. En moyenne 21% des échantillons étaient positifs chez les vaches RES contre 34% chez les CTL ($p = 0,0005$). La différence a été amplifiée dans les groupes génomiques avec -17% en faveur des vaches gRES ($p = 0,0002$). Cependant, à l'échelle de la race et du stade de lactation, bien que toutes dans le sens attendu, les différences ne sont significatives que lors du premier mois en race Normande.

Aucune différence de nombre et de distribution des pathogènes n'a été observée entre lignées.

2.2. REPONSES GENETIQUES EN RACE HOLSTEIN

L'étude des différences de fréquences alléliques entre lignées RES et CTL a mis en évidence 236 régions de 100 kb significativement différentes à 1%, c'est-à-dire dont la différence de fréquence entre lignées est supérieure à 6%. 24 de ces régions sont différentes à 1%, soit une différence supérieure à 9%. Sur les 236 régions, 92 sont déjà comprises dans un QTL utilisé dans l'évaluation génomique française des cellules ou des mammites cliniques.

La région avec la différence de fréquence la plus forte (12,2%) est située dans le chromosome 7 à 52,2 Mb. Elle contient 3 gènes non décrits dans la base de données Ensembl (Release 100) et n'est pas incluse dans un QTL connu. Les régions flanquantes entre 52,1 et 52,6 Mb sont aussi significatives, avec une différence de fréquence de 7 à 9%. Elles contiennent 12 gènes, tous en lien avec le transport du calcium.

Un seul des 280 gènes compris dans les régions significatives est lié à la résistance aux maladies : APCS (amyloid P component, serum). Il se situe dans la région vers 10,1 Mb du chromosome 3 qui présente une différence de 10% et est comprise dans deux QTL de l'évaluation cellules.

2.3. REPONSES IMMUNITAIRES

La capacité des animaux issus de la sélection divergente à déclencher une réponse inflammatoire lors d'une infection mammaire a été évaluée par injection intra-mammaire de lipopolysaccharide. L'injection intra-mammaire de ce composé, issu de la paroi des bactéries à Gram négatif telles qu'*Escherichia coli*, permet de déclencher une réponse inflammatoire qui mime celle observée dans les premières étapes d'une mammité à *E. coli*.

L'inflammation déclenchée par l'injection de LPS a été suivie par comptage des cellules du lait et dosages des molécules de l'inflammation (IL-6 et IL1b) à différents temps (Figure 2). Elle a été observée dans tous les quartiers traités avec un pic observé 8h post-injection et a entraîné une diminution de la production laitière équivalente entre les vaches « résistantes » et « contrôles » (Figure 3).

La comparaison des données obtenues pour les vaches RES et CTL a montré que la production laitière a été diminuée de façon équivalente entre les vaches des deux groupes. Une diminution statistiquement significative ($p < 0,05$) de la quantité d'IL-6 dans le lait et des comptages cellulaires du lait ($p < 0,05$) a été observée 8h post-injection chez les vaches « résistantes » (Figure 4).

Ces résultats indiquent que les vaches RES et CTL sont capables de répondre à une épreuve inflammatoire LPS mais que le pic de réponse est plus faible chez les vaches RES.

3. DISCUSSION

Grace à la divergence créée dans chaque race, une différence de 1,5 écart type génétique était attendue entre les vaches RES et CTL, soit 0,75 point de SCS et environ 7% d'incidence de MC. La différence moyenne observée de 0.7 point de SCS et de 10% d'incidence de MC montre que la sélection a été efficace et que les objectifs ont été atteints avec seulement deux générations. Cependant la réponse à la sélection a été contrastée avec un résultat inverse observé sur les mammites des vaches Normande en première lactation. Celui-ci peut s'expliquer par des effectifs plus faibles dans notre étude, par

la très faible héritabilité des MC et par une moindre précision des prédictions génomiques due à la population plus petite et à l'utilisation de QTL détectés principalement en race Holstein. Pour observer la différence attendue, il faudrait donc sélectionner sur un nombre de générations plus important. En

Figure 2: Mesure des SCS et dosages IL-6 et IL-1 β à t=4h p.i. (A, B, C) et 8h p.i. (D, E, F) dans les vaches « résistantes » et « contrôles ».

Les valeurs indiquées sont celles obtenues pour chaque individu ainsi que la médiane, Q1 et Q3 pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées par un test de Wilcoxon (* $p < 0.05$).

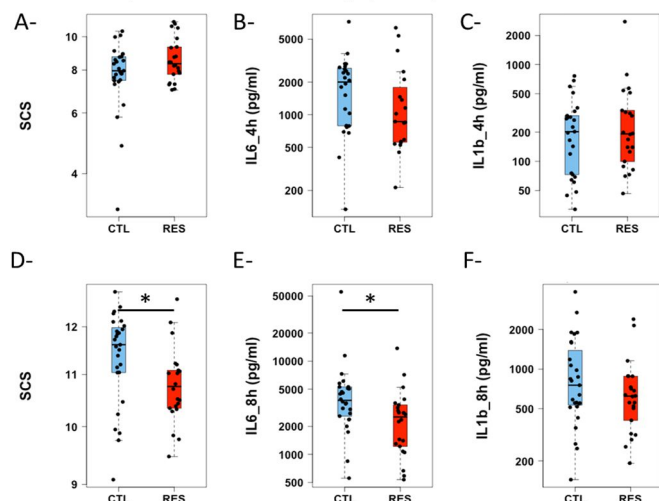


Figure 3: Production laitière au cours du temps en pourcentage de la production mesurée 1 jour avant l'épreuve inflammatoire.

Les valeurs indiquées sont celles obtenues pour chaque individu ainsi que la médiane, Q1 et Q3 pour chaque groupe.

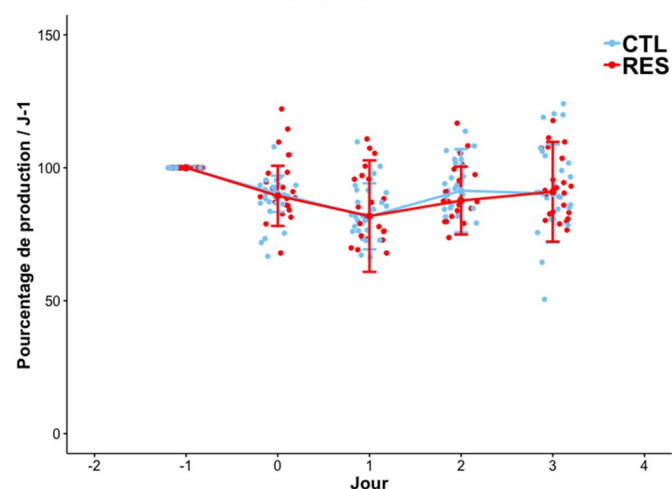
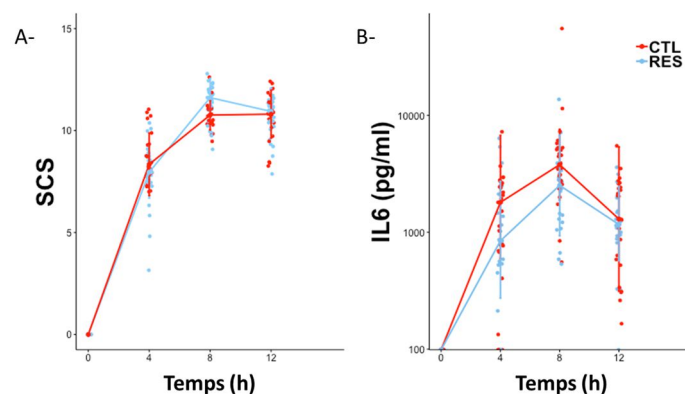


Figure 4: Evolution du SCS (A) et de la quantité d'IL-6 (B) dans le lait à différents temps après injection de LPS.

Les valeurs indiquées sont celles obtenues pour chaque individu ainsi que la médiane, Q1 et Q3 pour chaque groupe.



effet, l'analyse de la base nationale a montré que la sélection sur les MC en race Normande était possible avec une différence observée de 13% de MC entre les vaches présentant une différence d'index de 2 écarts types génétiques (Minery, 2016).

Les résultats de bactériologie ont montré que les vaches résistantes ont une mamelle plus saine tout au long de la lactation mais elles ne semblent pas présenter de profil bactériologique différent, aussi bien au cours de la lactation qu'au cours d'une mammite, suggérant que la résistance ne serait pas liée à une résistance à un pathogène particulier.

L'analyse des fréquences des variants entre lignées Holstein n'a pas révélé de région majeure impliquée dans l'immunité, notamment la région du gène codant pour l'IL6. Seule la région du gène APCS est ressortie significativement différente entre les vaches RES et CTL. Son transcrit, fortement exprimé dans le foie, centre métabolique et immunologique de la vache (Moyes *et al*, 2016), est impliqué dans plusieurs voies biologiques dont la réponse immunitaire innée. Plusieurs autres régions sont détectées, mais sans lien évident avec l'immunité.

Les vaches RES et CTL ne semblent pas se distinguer par leur capacité à déclencher une réponse inflammatoire : dans les deux groupes, dès 4h, une réponse inflammatoire d'intensité équivalente est observée. En revanche les résultats de l'épreuve inflammatoire montrent une réponse différente 8h post-injection. Ce résultat suggère que les vaches du groupe « résistantes » sont capables de mieux contrôler la réponse inflammatoire, une fois celle-ci enclenchée. Lors d'une infection par un agent pathogène de type *E. coli*, généralement responsable d'infections cliniques, une réponse plus forte entraînerait de plus forts dommages tissulaires alors que l'agent infectieux serait déjà éliminé. En effet, lors d'infections expérimentales, la charge bactérienne commence à décliner alors que la réponse inflammatoire n'est pas encore à son pic. Une vache plus résistante aux mammites serait donc plus apte à mieux contrôler l'infection pour éviter les dommages tissulaires néfastes à la production laitière.

CONCLUSION

Les réponses à la sélection observées sont proches de celles attendues malgré une taille de population limitée : 0,7 point sur le SCS des vaches résistantes contre 0,75 attendu ; 10% d'incidence de MC chez les vaches résistantes contre 7% attendus. Cependant les résultats sur les mammites en race Normande sont beaucoup moins marqués en première lactation.

L'analyse génétique est à poursuivre à l'échelle des variants et en race Normande pour identifier d'éventuelles mutations candidates sur la résistance aux mammites.

D'autres phénotypes restent à explorer pour identifier des marqueurs de résistance (spectres MIR, statut métabolique, conformation, ...) et des analyses supplémentaires sont en cours pour étudier la relation génétique entre résistance aux mammites et réponse inflammatoire, ainsi que le lien avec le métabolisme énergétique.

Les auteurs remercient l'équipe de la ferme expérimentale du Pin pour le phénotypage, le laboratoire Laboce (35306 Fougères) pour les bactériologies et Valogene pour les prédictions génomiques.

Fourichon, C., F. Beaudeau, N. Bareille, H. Seegers. 2001. Incidence of health disorders in dairy farming systems in western France. *Livest. Prod. Sc.* 68: 157-170.

Govignon-Gion, A., R. Dasseville, G. Baloché and V. Ducrocq. 2016. Multiple trait genetic evaluation of clinical mastitis in three dairy cattle breeds. *Animal*. 10: 558-565

Minery, S. 2016. La génétique, un levier pour mieux contrôler les mammites chez les vaches laitières. 6ème IDF Mastitis conference, Moyes, K. M., P. Sørensen, and M. Bionaz. 2016. The impact of intramammary *Escherichia coli* challenge on liver and mammary transcriptome and cross-talk in dairy cows during early lactation using RNAseq. *PLoS One* 11:e01574