



HAL
open science

Intérêt d'une approche multicritère pour la caractérisation et la typologie de la santé chez la vache laitière

Jérémy Lesueur

► **To cite this version:**

Jérémy Lesueur. Intérêt d'une approche multicritère pour la caractérisation et la typologie de la santé chez la vache laitière. Biologie animale. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2023. Français. NNT : 2023INPT0118 . tel-04457223

HAL Id: tel-04457223

<https://theses.hal.science/tel-04457223>

Submitted on 14 Feb 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Infectiologie, Physio-pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

M. JEREMY LESUEUR

le mardi 12 décembre 2023

Titre :

Intérêt d'une approche multicritère pour la caractérisation et la typologie
de la santé chez la vache laitière

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Interactions Hôtes - Agents Pathogènes (IHAP)

Directeur(s) de Thèse :

M. GILLES FOUCRAS

M. FABIEN CORBIERE

Rapporteurs :

MME CHRISTINE FOURICHON, ONIRIS - NANTES

M. SIMON DUFOUR, UNIVERSITE DE MONTREAL

Membre(s) du jury :

MME NICOLE HAGEN, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Président

M. FABIEN CORBIERE, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Invité(e)

M. GILLES FOUCRAS, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

Jérémy LESUEUR

*Intérêt d'une approche multicritère pour la caractérisation et la typologie de la santé
chez la vache laitière*

Rapporteurs : Christine FOURICHON et Simon DUFOUR

Résumé

Intérêt d'une approche multicritère pour la caractérisation et la typologie de la santé chez la vache laitière

En réponse à la demande croissante en produits laitiers, les programmes de sélection génétique se sont principalement attachés à l'amélioration des caractères de production, qui sont corrélés négativement à divers caractères fonctionnels. En conséquence, la sélection génétique s'est accompagnée d'une détérioration de la santé des vaches laitières, en particulier de la santé mammaire. Bien que l'intégration récente de caractères fonctionnels en sélection ait permis une certaine amélioration, la prise en compte de la compétence immunitaire serait un atout pour une amélioration plus englobante de la santé. Une telle démarche représente une opportunité pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents.

Cette thèse s'inscrit dans ce cadre en proposant une investigation de la diversité de la réponse immunitaire des vaches laitières en lien avec leur parcours de vie, leurs performances et leur fond génétique. À cette fin, une méthode de criblage de la réponse immunitaire a été développée. Elle repose sur le dosage simultané par multiplexage de quinze cytokines impliquées dans les voies innée et adaptative de la réponse immunitaire après stimulation *ex vivo* d'échantillons de sang total. Les agents de stimulation comprenaient trois agents responsables de mammites (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus uberis*) et trois ligands des récepteurs Toll-like (LPS, FSL-1 et Gardiquimod). Ce protocole a été appliqué trois mois environ après le vêlage chez 107 vaches issues d'une sélection divergente sur la résistance aux mammites.

Dans une première étude, nous montrons que chaque *stimulus* bactérien induit un profil de sécrétion caractéristique, et que seulement trois cytokines (IFN- γ , IL-1 β et TNF- α) sont suffisantes pour discriminer les différents *stimuli* étudiés entre eux. Les résultats indiquent par ailleurs des similitudes, sans superposition totale, entre les réponses aux *stimuli* bactériens et aux ligands des récepteurs Toll-like auxquels ils sont classiquement associés.

Dans une seconde étude, nous nous sommes intéressés aux liens potentiels entre différents index génétiques et indicateurs physiologiques, et la variabilité inter-individuelle de la réponse cytokinique au LPS. Ces investigations ont ensuite été étendues aux réponses associées à l'ensemble des six *stimuli* utilisés. Les résultats suggèrent l'existence d'un phénomène d'immunosénescence précoce observable dès la deuxième lactation. Le niveau inflammatoire basal et différents indicateurs du déficit énergétique en début de lactation sont corrélés ce qui soutient l'existence d'un lien entre métabolisme énergétique et régulation de la réponse immunitaire. La corrélation négative entre l'index génétique pour les cellules somatiques et le

niveau de réponse immune, observée pour plusieurs *stimuli*, milite en faveur d'une investigation approfondie des déterminismes génétiques et des mécanismes physiopathologiques liant la sélection génétique pour la résistance aux mammites et la réponse immunitaire. Une analyse de la typologie de la réponse immunitaire montre des corrélations fortes entre intensité de la réponse, d'une part, aux trois *stimuli* bactériens et, d'autre part, aux trois ligands des récepteurs Toll-like. Ces résultats suggèrent que la compétence immunitaire, à l'échelle d'une vache, est similaire, sans être totalement identique, pour les différents *stimuli* étudiés malgré leurs natures assez diverses. Enfin, l'analyse de la variabilité interindividuelle de la réponse immunitaire a conduit, pour certains *stimuli*, à l'identification de groupes de vaches de faible effectif présentant des réponses de très forte intensité. Ces résultats méritent des investigations complémentaires afin d'identifier les déterminants génétiques et physiopathologiques de ces différences, et des liens avec une éventuelle expression clinique.

Finalement, nos travaux ont permis le développement d'une méthode d'évaluation de la compétence immunitaire performante et simple à mettre en œuvre. Les méthodes d'analyse employées et les résultats obtenus représentent un premier pas vers le développement de biomarqueurs de l'immunocompétence des bovins. Néanmoins, l'analyse de ce type de données complexes représente un réel défi nécessitant des développements méthodologiques avant que des interventions ciblées ou que de nouvelles stratégies de sélection génétique fondées sur ces indicateurs permettent d'améliorer la durabilité et la rentabilité des exploitations laitières bovines.

Abstract

Evaluation of a multicriteria approach for the characterization and typology of health in dairy cows

In response to the growing demand for bovine-origin dairy products, genetic selection programs have primarily focused on improving production traits. As these traits are negatively correlated with various functional traits, genetic selection has been accompanied by a deterioration in the health of dairy cows, particularly udder health. While the recent integration of functional traits into selection programs has allowed for some improvements, considering immune competence would be an asset for an overall health improvement. Such an approach is an opportunity for a better understanding of the underlying mechanisms.

This thesis fits into this framework by proposing an investigation into the diversity of the immune response of dairy cows in relation to their life path, performances, and genetic background. For this purpose, a screening method for the immune response has been developed. It consists in simultaneously measuring fifteen cytokines involved in the innate and adaptive pathways of the immune response after *ex vivo* whole blood stimulation assays. Stimulation agents included three mastitis agents (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus uberis*) and three Toll-like receptor ligands (LPS, FSL-1, or Gardiquimod). This protocol was applied approximately three months after calving to 107 cows from a divergent selection for mastitis resistance.

In a first study, we show that each bacterial *stimulus* induces a specific cytokine signature, and only three cytokines (IFN- γ , IL-1 β , and TNF- α) are sufficient to discriminate between the different *stimuli* studied. The results also indicate similarities, without complete overlap, between responses to bacterial *stimuli* and Toll-like receptor ligands they are classically associated with.

In a second study, we investigated potential links between different breeding values, physiological indicators, and the inter-individual variability of cytokine response to LPS. These investigations were then extended to responses associated with all six *stimuli* used. The results suggest the existence of an early immunosenescence phenomenon observable from the second lactation. Basal inflammatory levels and various indicators of energy deficit at the beginning of lactation were correlated, supporting a link between energy metabolism and immune response regulation. The negative correlation between the breeding values for somatic cells and the level of immune response, observed for several *stimuli*, advocates for an in-depth investigation of genetic determinants and pathophysiological mechanisms linking genetic selection for mastitis resistance and immune response. An analysis of the typology of immune response shows strong correlations between the intensity of

response, on one hand, to the three bacterial *stimuli* and, on the other hand, to the three Toll-like receptor ligands. These results suggest that immune competence, on a cow scale, is similar, though not entirely identical, for the different *stimuli* studied, even though they are of quite diverse natures. Finally, the analysis of inter-individual variability in immune response has led, for some *stimuli*, to the identification of small groups of cows with very intense responses. These results warrant further investigation to identify the genetic and pathophysiological determinants of these differences and their links to possible clinical expression.

Finally, our work has led to the development of an effective method for evaluating immune competence that is simple to implement. The analysis methods employed and the results obtained represent a first step toward the development of biomarkers for bovine immunocompetence. However, the analysis of such complex data represents a real challenge requiring methodological developments before targeted interventions or new genetic selection strategies based on these indicators can improve the sustainability and profitability of bovine dairy farms.



Les animaux malades de la peste

Jean de la Fontaine, Livre septième, fable I

Dessin de Gustave Doré, gravure sur bois d'Adolphe Pannemaker et Albert Doms.
Planche publiée dans l'édition en 2 volumes des Fables de Jean de la Fontaine, chez
Louis Hachette (Paris), 1867, tome 2, p. 6

© Bibliothèque nationale de France

Remerciements

À Christine FOURICHON et Simon DUFOUR,
pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs
de cette thèse,
Veuillez accepter mes hommages respectueux.

À Nicole HAGEN,
pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être examinatrice
de cette thèse.
Veuillez accepter mes hommages respectueux.

À Gilles FOUCRAS et Fabien CORBIERE,
pour m'avoir respectivement dirigé et co-dirigé tout au
long de cette thèse.
Sincères remerciements.

À Sébastien DÉJEAN et Didier CONCORDET,
pour m'avoir conseillé au fil des comités de suivi de thèse,
Sincères remerciements.

**À Nathan CEBRON, Sarah WALACHOWSKY et
Rachel LEFEBVRE,**
pour la réalisation des dosages des cytokines et l'accès aux
données d'élevage,
Un grand merci.

À Louise BÉRY,
pour l'aide à la rédaction, la relecture du manuscrit et tout le reste,
Un immense merci.

La reproduction d'extraits de cette thèse est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée comme suit :

Lesueur, J. (2023). *Intérêt d'une approche multicritère pour la caractérisation et la typologie de la santé chez la vache laitière* [Thèse de doctorat], Université de Toulouse

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des figures	xvii
Liste des tableaux	xix
Codes sources	xxi
Liste des abréviations	xxiii
1. Introduction générale	1
1.1. Contexte et enjeux de la filière laitière bovine	1
1.1.1. Enjeux sociaux et économiques	1
1.1.2. Enjeux environnementaux	2
1.1.3. Enjeux sanitaires	3
1.2. Amélioration des performances de production : effets de la sélection génétique	5
1.2.1. Évolution des objectifs de sélection chez les vaches laitières .	5
1.2.2. Index génétiques	6
1.2.3. Conséquences de la sélection génétique sur les caractères fonctionnels	7
1.2.4. Sélection génétique et compétence immunitaire	8
1.3. Détérioration de la santé mammaire : les mammites	10
1.3.1. Généralités	10
1.3.2. Etiologie	22
1.3.3. Mesures de maîtrise et de prévention	24

1.3.4. Interrelations entre activité immunitaire, inflammation et troubles de la santé en péripartum	26
1.4. Biomarqueurs et évaluation de la compétence immunitaire	32
1.4.1. Biomarqueurs	32
1.4.2. Évaluation de la compétence immunitaire	38
2. Étude expérimentale	43
2.1. Objectifs scientifiques, question de recherche et stratégie de l'étude .	43
2.2. Matériels et méthodes généraux	46
2.2.1. Population d'étude	46
2.2.2. Données d'élevage	47
2.2.3. Collecte, préparation et stimulation des échantillons	47
2.2.4. Dosage des cytokines et des chimiokines	49
2.3. Évaluation d'une méthode de profilage des cytokines sur sang entier et caractérisation de la diversité de la réponse immunitaire cellulaire	51
2.3.1. Contexte, problématique et objectifs	51
2.3.2. Matériels et méthodes	52
2.3.3. Résultats	53
2.3.4. Conclusion	54
2.4. Investigation des facteurs génétiques et environnementaux influençant la réponse cytokinique sur sang entier	85
2.4.1. Cas de la stimulation au LPS	85
2.4.2. Extension aux autres <i>stimuli</i>	123
3. Discussion générale	147
3.1. Stimulation <i>ex vivo</i> de sang total et technologie Luminex [®] xMAP [®] : une combinaison fiable et simple à mettre en œuvre	148
3.2. Des signatures cytokiniques propres à chaque <i>stimulus</i>	150
3.3. Une compétence immunitaire variable selon des facteurs génétiques et environnementaux	153
3.4. Une compétence immunitaire similaire d'un <i>stimulus</i> bactérien à l'autre	155
3.5. Limites et pistes d'amélioration	156

3.6. Perspectives	160
4. Conclusion générale	163
Bibliographie	167
Annexes	213
A. Contexte économique et social	213
B. Index génétiques	215
C. Multiplexage : technologie Luminex® xMAP®	217
C.1. Technologie xMAP®	217
C.2. Instruments de mesure	219
D. Synthèse des résultats des régressions linéaires	222
E. Cercles des corrélations	226

Table des figures

1.1. Taux d'incidence des infections mammaires au cours d'un cycle de lactation	14
1.2. Schéma de synthèse du paradigme traditionnel	29
1.3. Schéma de synthèse du nouveau paradigme	31
2.1. <i>Stimuli</i> et TLR associés.	45
2.2. HCPC conduite sur les concentrations des cytokines issues des situations HKEC, HKSA et HKSU	136
2.3. HCPC conduite sur les concentrations des cytokines issues des situations LPS, FSL et GDQ	137
2.4. HCPC conduite sur les valeurs <i>delta</i> des concentrations des cytokines issues des situations HKEC, HKSA et HKSU	138
2.5. HCPC conduite sur les valeurs <i>delta</i> des concentrations des cytokines issues des situations LPS, FSL et GDQ	139
2.6. Distribution des index génétiques et des caractères phénotypiques au sein de chaque <i>cluster</i> issu des HCPC conduites sur les concentration absolues des cytokines	142
2.7. Distribution des index génétiques et des caractères phénotypiques au sein de chaque <i>cluster</i> issu des HCPC conduites sur les valeurs <i>delta</i> des cytokines	143
2.8. Similitudes entre les différentes partitions issues des HCPC	144
2.9. Corrélations de Spearman entre les composantes principales issues des ACP conduites sur les concentrations et les valeurs <i>delta</i> des cytokines . .	145
1. Formation de la liaison amide à la surface des microbilles	218
2. Principes de fonctionnement de la technologie xMAP® et du MAGPIX® .	221

3.	Résultats des régressions linéaires conduites sur les concentrations des cytokines issues des situations HKEC, HKSA et HKSU	222
4.	Résultats des régressions linéaires conduites sur les concentrations des cytokines issues des situations LPS, FSL-1 et GDQ	223
5.	Résultats des régressions linéaires conduites sur les valeurs <i>delta</i> issues des situations HKEC, HKSA et HKSU	224
6.	Résultats des régressions linéaires conduites sur les valeurs <i>delta</i> issues des situations LPS, FSL-1 et GDQ	225
7.	Cercles des corrélations relatifs aux ACP conduites sur les concentrations absolues des cytokines.	226
8.	Cercles des corrélations relatifs aux ACP conduites sur les valeurs <i>delta</i> des cytokines.	227

Liste des tableaux

1.1. Classification des agents responsables de mammites	22
2.1. <i>Stimuli</i> auxquels les prélèvements sanguins ont été exposés.	48
2.2. Synthèse des résultats des régressions linéaires conduites sur les concentrations des cytokines.	130
2.3. Synthèse des résultats des régressions linéaires conduites sur les <i>delta</i> des cytokines.	133
1. Évolution des performances économiques des exploitations bovines laitières en Europe de 2008 à 2019 (FADN)	213
2. Index génétiques fonctionnels.	215
3. Index génétiques de production.	215
4. Index génétiques morphologiques.	216

Codes sources

Par souci de transparence et de reproductibilité, les codes sources développés dans le cadre de cette thèse sont disponibles à l'adresse suivante :

<https://doi.org/10.5281/zenodo.10631894>

Liste des abréviations

- ACP** Analyse en Composantes Principales
- ADCC** cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
- ADN** acide désoxyribonucléique
- AGNE** acides gras non estérifiés
- AIC** Akaike Information Criterion
- ANSES** Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
- ARNm** acides ribonucléiques messagers
- ARNss** acides ribonucléiques à simple brin
- ARS** acidose ruminale subaiguë
- BAC** Biofilm Adhesion Component
- BEA** bien-être animal
- BEN** bilan énergétique négatif
- BEST** BEST (Biomarkers, EndPointS, and other Tools) Resource
- BHB** β -hydroxybutyrate
- BVD** diarrhée bovine virale
- CCD** charge-coupled device
- CCL11** chimiokine (C-C motif) ligand 11
- CCL2** chimiokine (C-C motif) ligand 2
- CCL24** chimiokine (C-C motif) ligand 24
- CCL26** chimiokine (C-C motif) ligand 26
- CCL3** chimiokine (C-C motif) ligand 3
- CCL4** chimiokine (C-C motif) ligand 4
- CCS** concentration des cellules somatiques
- CD** cellules dendritiques

CMH complexe majeur d'histocompatibilité
CMH I complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH II complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
cellules NK cellules Natural Killer
CPA cellules présentatrices d'antigène
CSF colony-stimulating factor
CV coefficient de variation
CXCL10 chimiokine (C-X-C motif) ligand 10
CXCL8 chimiokine (C-X-C motif) ligand 8
DAMP Damage-Associated Molecular Pattern
DEL diodes électroluminescentes
EDTA acide éthylène-diamine-tétra-acétique
EID2 ENHanCEd Infectious Diseases
ELISA enzyme-linked immunosorbent assay
FCO fièvre catharrale ovine
FPCM lait corrigé par les matières grasses et les protéines
FSL-1 fibroblast-stimulating lipopeptide 1
G6P glucose-6-phosphate
G6PDH glucose-6-phosphate déshydrogénase
G-CSF granulocyte colony-stimulating factor
GDQ gardiquimod
GIDEON Global Infectious Disease and Epidemiology Network
GIEC groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat
GM-CSF granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GNB granulocytes basophiles
GNE granulocytes éosinophiles
GNN granulocytes neutrophiles
HCPC Classification Hiérarchique sur Composantes Principales
HKEC Heat-killed Escherichia coli
HKSA Heat-killed Staphylococcus aureus
HKSU Heat-killed Streptococcus uberis

IA insémination artificielle
IFN- γ interféron γ
IgA immunoglobulines A
IgE immunoglobulines E
IgG immunoglobulines G
IgM immunoglobulines M
IHAP Interactions Hôtes-Agents Pathogènes
IL-1 interleukine 1
IL-10 interleukine 10
IL-12 interleukine 12
IL-13 interleukine 13
IL-17A interleukine 17A
IL-1 α interleukine 1 α
IL-1 β interleukine 1 β
IL-1RA interleukine 1RA
IL-2 interleukine 2
IL-22 interleukine 22
IL-23 interleukine 23
IL-3 interleukine 3
IL-4 interleukine 4
IL-6 interleukine 6
INAA index attache avant mamelle
INAH index hauteur attache mamelle
INAJ index angle du jarret
INAS index aspect
INCC indicateur capacité corporelle
INCELL index concentration cellulaire
INDEMG index matière grasse
INDEMP index matière protéique
INDET B index taux butyreux
INDETP index taux protéique

INEA index écart avant des trayons
INEC index état corporel
INEL index économique laitier
INEQ index équilibre avant-arrière de la mamelle
INFERG index fertilité génisse
INFERS index synthèse fertilité
INFERT index fertilité vache
INFNAI index facilité de naissance
INFVEL index facilité de vêlage
INHS index hauteur au sacrum
INIA index implantation arrière des trayons
INIB index inclinaison du bassin
INLAIT index lait
INLGFO index longévité fonctionnelle
INLI index largeur ischions
INLO index locomotion
INLP index largeur poitrine
INLT index longueur des trayons
INMACL index mammite clinique
INMA index mamelle
INME index membres
INMO index morphologique
INMR index membre vue arrière
INPC index profondeur du corps
INPI index angle du pied
INPJ index distance plancher-jarret
INPS index profondeur du sillon de la mamelle
INRAE Institut National de Recherche pour l’Agriculture, l’Alimentation et l’Environnement
INSAMA index santé de la mamelle
ISU index de synthèse Upra

INTE index tempérament

INTR index vitesse de traite

INVIA1 index IVIA1

INVITN index vitalité naissance

INVITV index vitalité vèlage

IUCN Union internationale pour la conservation de la nature

IVIA1 intervalle entre le vèlage et la première insémination artificielle

IVV intervalle entre vèlages consécutifs

LB lymphocytes B

LBE leucose bovine enzootique

LDH lactate déshydrogénase

LPS lipopolysaccharide

LSA Loi Santé Animale

LT lymphocytes T

LT4 lymphocytes T CD4+

LT8 lymphocytes T CD8+

LTC lymphocytes T cytotoxiques

LT $\gamma\delta$ lymphocytes T $\gamma\delta$

LTH lymphocytes T-helper

LTH naïfs lymphocytes T-helper naïfs

LTH1 lymphocytes T-helper de type 1

LTH17 lymphocytes T-helper de type 17

LTH2 lymphocytes T-helper de type 2

LTreg lymphocytes T régulateurs

MAMP Microbe-Associated Molecular Patterns

MFI Median Fluorescence Intensity

MIR moyen infrarouge

MLST Multilocus Sequence Type

MSI matière sèche ingérée

NEC note d'état corporel

OMSA Organisation mondiale de la santé animale

PAMP Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBMC cellules mononucléées sanguines périphériques
PCR Polymerase Chain Reaction
PLS-DA Partial Least Square Discriminant Analysis
PPA protéines de la phase aiguë
ppm parties par million
PRR Pathogen Recognition Receptors
SAA protéine sérique amyloïde A
SCS score de cellules somatiques
sPLS-DA sparse PLS-DA
TB taux butyreux
TGF transforming growth factor
TGF- β transforming growth factor β
TLR récepteurs Toll-like
TNF tumor necrosis factor
TNF- α tumor necrosis factor α
TP taux protéique
UMR Unité Mixte de Recherche
UTA Unité de Travail Annuel
VLDL very low density lipoprotein

Introduction générale

1.1 Contexte et enjeux de la filière laitière bovine

1.1.1 Enjeux sociaux et économiques

Selon le rapport *World population prospects 2019* des Nations Unies (1), la population mondiale devrait atteindre 9,7 milliards d'individus en 2050, soit un quart de plus qu'en 2020. Nourrir une telle population représente un défi majeur pour l'agriculture moderne. Avec des productions annuelles respectives de 337 et 887 millions de tonnes, la viande et le lait constituent une part non négligeable de l'alimentation humaine (2). D'un point de vue nutritionnel, les denrées alimentaires d'origine animale représentent 39% des apports protéiques (2). Bien que les protéines d'origine animale soient minoritaires face à celles d'origine végétale, leur part dans l'alimentation humaine est celle qui a le plus fortement augmenté entre 2000 et 2018 (+22% contre +8% (2)). En particulier, la production laitière bovine a connu une croissance significative entre 2000 et 2020 (489 contre 742 millions de tonnes soit une hausse de 53%)(3). Paradoxalement, le niveau d'insécurité alimentaire mondial a augmenté entre 2014 et 2021 (21,8% et 28,1% respectivement (2)) potentiellement en raison d'une augmentation des cours internationaux des produits alimentaires (2). Ainsi, bien avant d'être un enjeu de demain, répondre à la demande mondiale en denrées alimentaires d'origine animale est un enjeu bien actuel.

En Europe, le nombre d'élevages laitiers a fortement diminué au cours des dernières décennies (**Annexe A**). Cependant, cette baisse a été compensée par une augmentation de la taille des troupeaux et une augmentation de la productivité des animaux. En parallèle, la main d'œuvre est restée à un niveau constant et cela s'est traduit par une charge de travail croissante par Unité de Travail Annuel (UTA), par-

tiellement compensée par des investissements dans du matériel agricole (*Annexe A*). Ainsi, la hausse de la production laitière par élevage pour un nombre de travailleurs constant a permis une amélioration des revenus malgré la volatilité du prix du lait (*Annexe A*). Cependant, l'impact de ces différents changements sur la qualité de vie des éleveurs laitiers est multiple. Différentes études ont montré que les indicateurs de la qualité de vie les plus importants pour les éleveurs sont la santé, un travail qui a du sens, la situation familiale, l'éducation, le temps libre, les revenus et les conditions de logement. La santé et les revenus semblent être les indicateurs pour lesquels les éleveurs sont le moins satisfaits. De plus, l'amélioration des revenus est généralement associée à une augmentation de la charge de travail. Celle-ci réduit la flexibilité du temps de travail et augmente la charge mentale, directement liée à la santé mentale (4). Les systèmes de traite automatisée sont, dans certains cas, une bonne option pour pallier ce problème.

1.1.2 Enjeux environnementaux

Dans son sixième rapport d'évaluation (5), le groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) confirme l'origine anthropique du changement climatique, déjà mise en évidence dans son cinquième rapport en 2014 (6). Les émissions de gaz à effet de serre (dont les principaux sont le dioxyde de carbone, le méthane et l'oxyde nitreux) sont, d'après les estimations, responsables à plus de 50% de ce changement (5). La concentration en méthane atmosphérique a connu une hausse rapide entre 2014 et 2017 (environ 1820 et 1850 parties par million (ppm) respectivement) imputable aux secteurs des énergies fossiles et de l'élevage (7), en particulier celui des ruminants du fait de leurs fermentations entériques (39% des émissions liées à l'agriculture en 2019)(8). L'élevage de ruminants sera donc très certainement contraint d'adopter de nouvelles stratégies afin de réduire sa contribution au réchauffement climatique. L'impact environnemental de l'élevage va au-delà du changement climatique. En effet, l'élevage est une cause, directe et indirecte, de l'érosion de la biodiversité. En plus du changement climatique, l'*Evaluation des écosystèmes pour le millénaire* (9) a identifié quatre causes majeures du déclin de la

biodiversité : le changement d'usage des habitats, la pollution, la surexploitation des ressources biologiques et les espèces exotiques envahissantes. L'élevage a une action sur chacune de ces causes. De plus, une étude exploitant les données produites par l'Union internationale pour la conservation de la nature (IUCN), l'Organisation mondiale de la santé animale (OMSA) et le Global Infectious Disease and Epidemiology Network (GIDEON) a démontré l'existence d'une corrélation positive entre la taille du cheptel bovin mondial et le nombre d'espèces sauvages menacées (10). Cette étude met également en évidence un lien entre l'accroissement du nombre de bovins et l'augmentation du nombre d'épidémies non seulement humaines, mais aussi animales. Bien que les méthodes employées dans cette étude soient fortement remises en cause et ses résultats sujets à caution, l'élevage pose question sur le plan environnemental, mais également en matière de santé publique humaine et vétérinaire.

1.1.3 Enjeux sanitaires

Parmi les 1300 espèces d'agents pathogènes répertoriées chez les bovins (chiffre calculé à partir de la base de données ENHanCED Infectious Diseases (EID2) (11)), 45 (soit 3,5%) sont zoonotiques (12). Ces agents peuvent être transmissibles à l'homme par voie directe ou indirecte, ou bien porter atteinte à la sécurité sanitaire des aliments. Dans un souci d'harmonisation de la gestion des maladies animales à l'échelle européenne, la Loi Santé Animale (LSA), entrée en application le 21 avril 2021, définit une nouvelle classification des maladies. Celle-ci concerne certaines zoonoses mais aussi les maladies pouvant mettre à mal les capacités de production d'une filière. Sur les soixante-trois maladies classées, dix-neuf concernent les bovins.

L'antibiorésistance est également un sujet de préoccupation en santé publique. En effet, l'intensification de l'élevage s'est accompagnée d'une hausse des troubles sanitaires et du recours aux antibiotiques (13). Ce dernier a favorisé l'apparition d'antibiorésistances chez les animaux de production (14) dont le risque de passage à l'homme n'est pas nul (15,16), notamment par le biais de la chaîne alimentaire. Ce risque est à l'origine des politiques publiques visant à réduire l'usage des antibiotiques

en médecine vétérinaire telles que le plan d'action pour combattre les menaces croissantes de la résistance aux antimicrobiens à l'échelle européenne et le plan EcoAntibio à l'échelle française.

En lien avec la santé, les attentes concernant la condition animale sont de plus en plus prégnantes, au moins dans les sociétés occidentales. D'après une enquête (17), les questions relatives au bien-être animal préoccupent davantage les jeunes adultes français que l'impact environnemental et les crises sanitaires liées à l'élevage. L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) définit le bien-être animal comme « l'état mental et physique positif lié à la satisfaction de ses besoins physiologiques et comportementaux, ainsi que ses attentes » (18). Bien que l'élevage bovin soit moins controversé que l'élevage de monogastriques, certaines pratiques ou troubles potentiellement algogènes tels que l'écornage, les boiteries et les mammites sont vivement critiqués (17). De même, les systèmes de production peu durables (importante consommation d'intrants) ou empêchant les animaux d'exprimer leurs comportements naturels (densité animale élevée, confinement des animaux ...) sont pointés du doigt (17). Finalement, ces controverses sont, en partie, le corollaire des changements structurels et fonctionnels de l'élevage, et des contraintes économiques inhérentes au secteur laitier.

Afin de répondre à la demande croissante de produits laitiers, les systèmes de production se sont intensifiés. Comme tout caractère phénotypique, la production laitière résulte des effets additifs de déterminants génétiques et environnementaux, et de leurs interactions (19). L'intensification de la production laitière s'est donc attachée à maîtriser ces différents déterminants. La sélection génétique en est la pierre angulaire (20).

1.2 Amélioration des performances de production : effets de la sélection génétique

1.2.1 Évolution des objectifs de sélection chez les vaches laitières

Motivée par la demande croissante en produits laitiers, la sélection génétique des vaches laitières a connu une évolution significative au fil des années. Initialement, elle s'est concentrée sur des caractéristiques telles que la conformation et l'aptitude au travail, caractères fondamentaux lorsque les bovins étaient utilisés pour la traction (21). Cependant, lorsque l'industrie laitière s'est organisée et que la production laitière est devenue l'objectif premier pour certaines races, les objectifs de sélection se sont focalisés sur les caractères de production laitière et de composition du lait (20).

Les premiers efforts de sélection visaient à identifier les vaches ayant des capacités de production laitière supérieures sur la base d'évaluations visuelles de caractéristiques physiques telles que la conformation de la mamelle. Toutefois, cette approche en grande partie subjective manquait de précision.

Grâce au progrès des connaissances scientifiques et de la technologie, des mesures objectives et des approches fondées sur les données ont été adoptées (20). La mise en place d'organismes de contrôle des performances tels que le contrôle laitier et la création d'organismes de sélection ont permis de collecter des données précises et fiables sur les performances des animaux (22). Ainsi, la sélection des vaches laitières a pu s'appuyer sur des données objectives.

Les stratégies de sélection ont d'abord donné la priorité à la production laitière (20). Ensuite, à la demande de l'industrie, la composition du lait, en particulier sa teneur en matières grasses et en protéines, s'est ajoutée aux critères de sélection (20).

Ces dernières années, les caractères pris en compte pour la sélection se sont étendus à d'autres caractéristiques en lien avec l'aptitude fonctionnelle des animaux,

c'est-à-dire leur capacité à maintenir leur niveau de production tout en minimisant les intrants (23). Ces caractères sont dits « fonctionnels » et présentent, au même titre que ceux de production, un intérêt économique pour les élevages. Ils sont principalement liés aux performances de reproduction, à la santé mammaire et à la longévité (20,24). Cette évolution est le reflet de la prise de conscience de l'impact significatif des caractères fonctionnels sur la productivité et la rentabilité des vaches laitières.

Les différents caractères utilisés en sélection génétique étant de nature phénotypique, leur part génétique est évaluée au moyen d'index génétiques.

1.2.2 Index génétiques

Les index génétiques sont un outil essentiel dans les programmes de sélection. Ces derniers reflètent le potentiel génétique d'un animal pour un caractère donné. Dans le cadre de l'élevage bovin laitier, ces index sont particulièrement utiles pour améliorer les caractères de production et les caractères fonctionnels.

Initialement, les index étaient évalués à l'aide de méthodes statistiques combinant les données généalogiques et phénotypiques. Avec l'essor technologique, le calcul des index intègre maintenant les données génomiques. La sélection génomique s'appuie sur l'analyse de milliers de marqueurs génétiques répartis sur l'ensemble du génome. Cette approche permet de saisir une plus grande part de la variabilité génétique et permet, ainsi, de prédire les index avec davantage de précision. Cette avancée a été particulièrement bénéfique pour les caractères faiblement héréditaires ou ceux qui s'expriment tardivement (fertilité, longévité, production laitière ...). En effet, la sélection génomique permet de prédire le potentiel génétique des animaux bien avant leurs premiers contrôles de performance. Le *single-step Genomic Best Linear Unbiased Prediction* (ssGBLUP) est actuellement la méthode de référence pour l'évaluation génomique des index (25,26).

De plus, avec le développement de techniques de phénotypage haut débit (apparition de la phénotypique), le nombre de caractères sélectionnables a considérablement augmenté (24,27). Ceci a permis l'émergence de nouveaux objectifs de sélection :

santé (fièvre de lait, rétention des enveloppes fœtales, métrite, déplacement de caillette, cétose, boiterie, mammite), bien-être animal (BEA), productivité, impact environnemental, qualité et sécurité des produits (20,24).

Les principaux index utilisés en France sont présentés dans l'**Annexe B**.

Ainsi, les index permettent d'évaluer le potentiel génétique des animaux et d'accélérer le progrès génétique des troupeaux.

1.2.3 Conséquences de la sélection génétique sur les caractères fonctionnels

En plus d'une diminution de la diversité génétique et d'une hausse de la consanguinité chez les races laitières qui ont fait l'objet d'une sélection active, la sélection génétique basée sur des caractères de production a induit un déclin des caractères fonctionnels (28). Ce déclin résulte d'une corrélation génétique défavorable entre les caractères de production et les caractères fonctionnels (24,29–31). L'une des théories permettant d'expliquer cette corrélation défavorable est la théorie de l'allocation des ressources (32). En effet, selon cette théorie, les processus biologiques partageant une même ressource entrent en compétition lorsque celle-ci devient limitée. Les principaux caractères fonctionnels concernés par ce déclin sont les caractères relatifs aux performances de reproduction, à la santé, à la survie et à la résilience globale (28).

L'augmentation des performances de production est fortement associée à une diminution des performances de reproduction (33–35). Plus précisément, la sélection sur les caractères de production est associée à une reprise tardive du cycle œstral, une expression réduite de l'œstrus et une diminution du taux de réussite à l'insémination artificielle (IA). Les conséquences de ces défaillances sont multiples : augmentation de la réforme involontaire, de l'intervalle entre vêlages consécutifs (IVV), des coûts vétérinaires, réduction de la production laitière et ralentissement du progrès génétique (36). Malgré l'intégration relativement récente des performances de reproduction dans les schémas de sélection, les performances des vaches laitières hautes productrices restent suboptimales (37).

Les vaches hautes productrices sont également davantage sujettes aux troubles métaboliques, tels que la cétose ou encore la stéatose hépatique. Ces troubles sont la conséquence de besoins de production pouvant dépasser les apports de la ration alimentaire (38). La sélection sur les caractères de production sans tenir compte des risques métaboliques associés peut donc compromettre la santé des vaches et augmenter l'incidence d'autres maladies.

La corrélation négative entre les caractères de production et les caractères fonctionnels concerne également la santé mammaire. La hausse de l'incidence des mammites chez les vaches laitières est en grande partie liée à une baisse de la compétence immunitaire des animaux face aux agents pathogènes (39). Cette dernière est, entre autres, la conséquence d'une atteinte des barrières physiques de la mamelle telle que l'étanchéité des trayons. En effet, en lien avec la sélection d'animaux ayant une vitesse de traite cohérente avec une production laitière élevée, l'étanchéité des trayons s'est nettement dégradée (40).

Globalement, la détérioration de la santé est en grande partie due à une hausse de l'incidence des maladies infectieuses (déclin de la compétence immunitaire (30)) et métaboliques. La hausse de ces incidences induit des pertes économiques dues à une augmentation de la mortalité, des coûts vétérinaires, de la réforme précoce et à une diminution de la production laitière (41). L'intégration de la compétence immunitaire dans les programmes de sélection pourrait donc être une solution pour réduire la prédisposition aux maladies infectieuses endémiques (métrite et mammite).

1.2.4 Sélection génétique et compétence immunitaire

La sélection sur un caractère tel que la réponse immunitaire a pour objectif d'améliorer la résilience des individus. Celle-ci peut être définie comme la capacité d'un individu à maintenir sa production face à une maladie (42). La résilience est la résultante de deux composantes : la résistance et la tolérance. Ces deux notions correspondent respectivement à la capacité d'un hôte à limiter ou éliminer un agent pathogène et à la capacité d'un hôte à limiter les dommages causés, non seulement,

par un agent pathogène, mais aussi, par les réponses immunitaire et inflammatoire elles-mêmes (43).

Cependant, comme évoqué précédemment, la corrélation génétique entre les caractères de production et ceux de santé est défavorable (31). À titre d'exemple, la production laitière et l'incidence des mammites ont une corrélation génétique comprise entre 0,15 et 0,37 (44–46). Ainsi, dans l'espoir d'obtenir des animaux ayant à la fois un haut potentiel de production et une bonne compétence immunitaire, il est nécessaire d'intégrer conjointement ces caractères dans les schémas de sélection (47).

L'intégration des caractères de santé peut viser à améliorer la compétence immunitaire à l'égard d'une seule entité pathologique (48). Cependant, une telle approche peut conduire à une augmentation de la sensibilité à d'autres maladies. Les caractères de santé sélectionnés concernent donc généralement un éventail de maladies (49).

Par ailleurs, l'existence d'une corrélation négative entre les réponses immunitaires cellulaire et humorale (50,51) implique de prendre également en compte ces deux volets de la réponse immunitaire pour ne pas favoriser l'un au détriment de l'autre.

La sélection d'un caractère particulier nécessite que celui-ci soit héritable. L'héritabilité correspond à la part de variance d'un caractère pouvant être attribuée à la génétique (52). Pour les compétences immunitaires cellulaire et humorale, l'héritabilité a été estimée respectivement à 0,19 et 0,16-0,41 (variable selon l'isotype d'immunoglobuline) chez des vaches de race Prim'Holstein (51). Les modalités d'évaluation de la compétence immunitaire sont présentées dans la partie **1.4.2.1**. Bien qu'elle soit modérée, l'héritabilité de la compétence immunitaire est similaire à celle de certains caractères de production (53) et peut donc faire l'objet d'une sélection génétique.

La compétence immunitaire résultant d'un déterminisme polygénique (47), l'identification de l'ensemble des gènes la gouvernant est difficile. Les index permettent justement d'évaluer la valeur génétique d'un individu en s'affranchissant de l'identification de ces gènes (54). Les études d'association pangénomique (*genome-wide association study* en anglais) permettent d'associer des marqueurs génétiques à des caractères phénotypiques d'intérêt. Ce type d'analyse a été mis en œuvre sur des vaches de race Prim'Holstein et a permis d'identifier différents

marqueurs, gènes candidats et voies de signalisation associés à la compétence immunitaire (54). Ces marqueurs sont maintenant utilisés au Canada pour évaluer l'index génomique relatif à la compétence immunitaire (55).

Comme vu précédemment, la sélection portant sur des caractères de production a dégradé les caractères fonctionnels relatifs à la santé, en particulier la santé mammaire. Afin de mieux comprendre les conséquences de cette dégradation, la partie suivante présentera les principales caractéristiques des mammites ainsi que les mesures de maîtrise et de prévention associées. Elle présentera également l'ensemble des notions d'immunologie utiles à la compréhension des travaux conduits dans cette thèse.

1.3 Détérioration de la santé mammaire : les mammites

1.3.1 Généralités

1.3.1.1. Définition, contexte et enjeux

La mammite est une inflammation du parenchyme mammaire. On distingue les mammites cliniques, caractérisées par des modifications visibles ou palpables de la glande mammaire (induration, tuméfaction, œdème, chaleur ...) et/ou du lait (décoloration, présence de grumeaux, de sang ...), et les mammites subcliniques, caractérisées par une inflammation mesurable, mais en absence de signes cliniques (56).

Du fait de leur répartition mondiale (57) et de leurs conséquences négatives sur la production et la qualité du lait, les mammites font partie des maladies les plus communes et les plus coûteuses en élevage bovin laitier. Elles sont majoritairement causées par des bactéries.

Les conséquences économiques des mammites sont considérables. Le coût moyen d'un cas clinique est estimé à 224 euros (58). Ce montant varie en fonction de la sévérité du cas, du stade de lactation auquel il survient et du contexte économique

(coûts de production, prix de vente du lait ...). Les répercussions économiques des mammites ne se limitent pas aux élevages mais concernent l'ensemble de la filière laitière car, du fait de la présence de bactéries et de cellules immunitaires en grand nombre, le lait issu de mammites a une durée de conservation plus courte (59). La mammite est également à l'origine d'une baisse de rendement, notamment en production fromagère (60). Lorsque ces caractères sont dégradés, le lait peut même être considéré impropre à la consommation humaine.

Les conséquences sur le bien-être animal sont également importantes en raison de la douleur occasionnée et d'une potentielle atteinte de l'état général. Même les mammites cliniques légères (61) et probablement les mammites subcliniques (62) sont algogènes.

En matière de santé publique, les mammites ne sont pas à négliger non plus. En effet, certaines infections intramammaires asymptomatiques peuvent être dues à des agents zoonotiques tels que des bactéries appartenant aux genres *Campylobacter*, *Salmonella* ou encore *Listeria* (63). En éliminant la majorité de ces bactéries, la pasteurisation a permis de réduire fortement les menaces pour la santé humaine et d'augmenter la durée de conservation du lait et de ses dérivés. Par ailleurs, le recours aux antibiotiques peut favoriser la sélection de bactéries résistantes, en particulier dans les élevages nourrissant les veaux avec le lait écarté du tank, en raison de la présence potentielle de résidus d'antibiotiques (64).

1.3.1.2. Défenses de l'hôte

Défenses de la mamelle

Le sphincter du trayon est la première barrière anatomique s'opposant à l'entrée de germes dans la mamelle. Il est secondé par la kératine qui joue à la fois un rôle de barrière physique et chimique (sécrétion d'acide myristique, d'acide palmitoléique ... (65)) par ses activités bactéricide et bactériostatique (66). Par conséquent, les lésions de l'extrémité du trayon ou une production réduite de kératine augmentent la sensibilité aux mammites (67).

La réponse immunitaire joue un rôle important dans la résistance aux mammites (68). Ses effecteurs peuvent être de nature soluble ou cellulaire.

Il existe cinq types de facteurs solubles¹ : les immunoglobulines, la lactoferrine, le complément, le lysozyme et le système lactoperoxydase. Seuls les deux premiers seront traités, les autres jouant un rôle mineur dans la défense de la mamelle. Les immunoglobulines sont les seuls effecteurs solubles de la réponse immunitaire adaptative. Les classes d'immunoglobulines concernées sont les immunoglobulines G (IgG), les immunoglobulines M (IgM) et les immunoglobulines A (IgA). Les IgG et les IgM ont un rôle opsonisant, c'est-à-dire qu'elles facilitent la phagocytose des bactéries cibles par les granulocytes neutrophiles (GNN) (dominants lors de mammites) et les macrophages (principaux phagocytes de la mamelle saine). Les IgA empêchent la colonisation bactérienne en agglutinant les bactéries et en neutralisant les toxines bactériennes. Cependant, la concentration des IgA est beaucoup plus faible que celles des deux premières dans le lait des ruminants (68). La lactoferrine est le principal composant soluble participant à la réponse immunitaire innée. Il s'agit d'un chélateur des ions ferriques. Elle a donc un effet bactériostatique sur les bactéries dont la croissance dépend du fer telles que *Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus*. De plus, en chélatant les ions ferriques, la lactoferrine empêche la production de dismutase bactérienne, enzyme inactivant les superoxydes. Elle module également l'activité des macrophages, des lymphocytes et des granulocytes neutrophiles. L'activité bactériostatique de la lactoferrine est fortement réduite en présence de citrate, molécule tampon et chélatrice du fer sous une forme utilisable par les bactéries. Le citrate étant sécrété abondamment par les cellules épithéliales mammaires en cours de lactation et la concentration en lactoferrine étant maximale durant la phase d'involution mammaire, cette dernière exerce son rôle principalement pendant la période sèche. Toutefois, bien que la concentration en lactoferrine soit faible en cours de lactation, elle augmente fortement en cas d'inflammation.

Les principaux effecteurs cellulaires sont les GNN, les macrophages et les lymphocytes. Les macrophages sont les leucocytes les plus abondants de la mamelle saine. Ce sont des phagocytes et ils jouent aussi le rôle de cellules présentatrices d'antigène

1. Les cytokines sont également des facteurs solubles des réponses immunitaires innée et adaptative mais seront traitées ultérieurement.

(CPA). Ils sont donc capables de présenter les antigènes phagocytés aux lymphocytes T (LT). Cette étape de présentation permet d'initier la réponse immunitaire adaptative. Après activation, ils libèrent des chimiokines induisant le recrutement des GNN. Les GNN sont les leucocytes les plus abondants en début d'inflammation (> 90% des cellules du lait). Ils ont une activité phagocytaire et bactéricide via la production de radicaux libres (explosion oxydative). Les macrophages et les GNN jouent un rôle primordial dans l'élimination des bactéries. Leur activité est réduite en période péripartum (69,70). Les lymphocytes sont les principaux effecteurs de la réponse immunitaire adaptative. On distingue les LT des lymphocytes B (LB). Il existe plusieurs familles de LT : les lymphocytes T CD4+ (LT4) (ou lymphocytes T-helper (LTH)) et les lymphocytes T CD8+ (LT8) (ou lymphocytes T cytotoxiques (LTC)). Les LT4 orientent la réponse immunitaire en fonction des leucocytes qu'ils recrutent et éduquent (LT, LB ou macrophages). Les LT8 ont une activité de lyse des cellules infectées. Cette activité s'exerce sur les cellules présentant un antigène lié au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) tandis que les LT4 sont activés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). Les cellules Natural Killer (cellules NK) sont des cellules lymphoïdes ayant également une activité cytotoxique s'exprimant lors de l'interaction avec un anticorps. On parle de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Elle conduit à la libération de perforine, protéine cytolitique exerçant son action sur les cellules eucaryotes et les bactéries. Enfin, les LB ont pour rôle principal la sécrétion d'anticorps. Ils sont capables de capturer spécifiquement des antigènes et de les présenter aux LT4. En réponse, ces derniers vont stimuler la prolifération des LB, leur différenciation en plasmocytes ou en cellules mémoire, et la production d'anticorps.

L'efficacité des différentes défenses immunitaires présentées précédemment fluctue avec le stade de lactation. En effet, le tarissement est marqué par deux périodes à fort risque de mammite : l'involution mammaire et la colostrogenèse (Figure 1.1). La première période à risque s'explique par l'arrêt de la vidange de la glande et une augmentation de la pression intramammaire compromettant son étanchéité en raison de l'ouverture intermittente du sphincter (71). De plus, la lactoferrine peut mettre jusqu'à 28 jours pour atteindre sa concentration maximale (72) et, la caséine

et la matière grasse du lait résiduel réduisent l'efficacité des leucocytes (69). La seconde période à risque s'explique également par une perte d'étanchéité du canal du trayon du fait de la synthèse du colostrum (73). Tout comme le lait résiduel, ce dernier réduit l'efficacité des activités bactéricides des leucocytes. À cela s'ajoute le déficit énergétique autour du vêlage qui réduit l'activité bactéricide des neutrophiles (74). Un dernier facteur réduisant l'occurrence des infections intramammaires au cours de la période sèche est la formation du bouchon de kératine. Cette barrière physique est lente à s'établir et est souvent non fonctionnelle chez les vaches hautes productrices en raison de pertes de lait intermittentes (75).

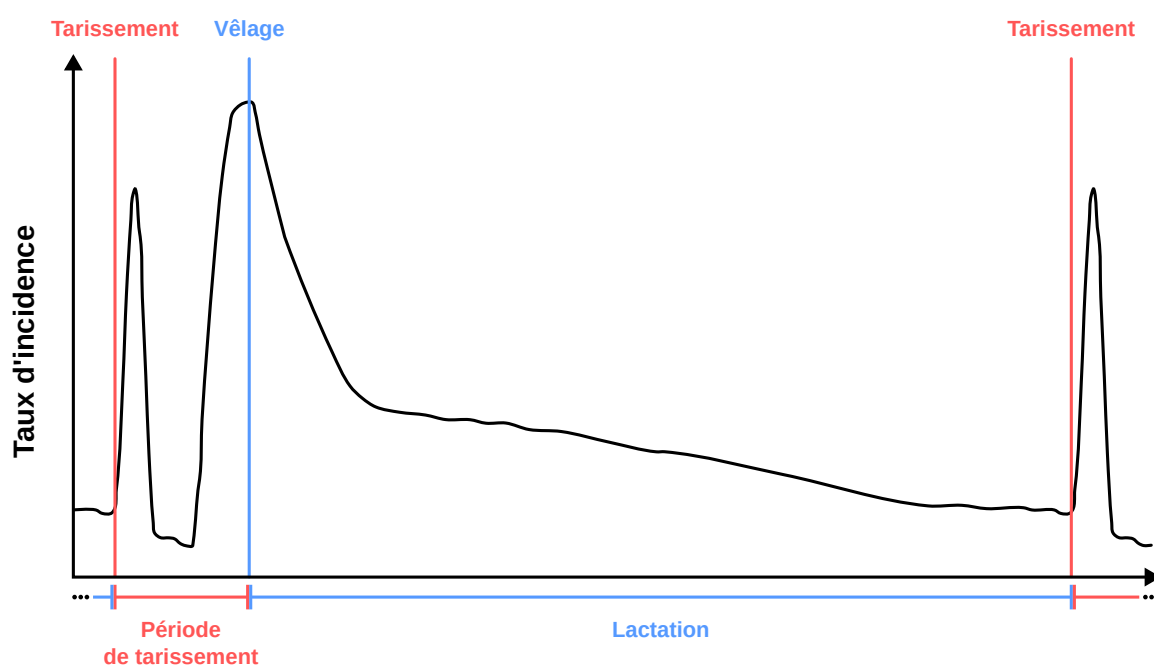


FIGURE 1.1. : Taux d'incidence des infections mammaires au cours d'un cycle de lactation (d'après Bradley et Green, 2004 (76)).

Ainsi, la mamelle dispose de nombreux moyens de défense contre les agents de mammite. Ces systèmes de défense reposent sur la capacité de l'hôte à détecter un agent pathogène et à initier une réponse adéquate. Une grande partie du protocole expérimental de cette thèse s'intéressant à ces deux points, les paragraphes suivants s'attacheront à expliquer de manière synthétique et simplifiée leurs mécanismes.

Détection des agents pathogènes : les *Pathogen-Associated Molecular Patterns* et les récepteurs *Toll-like*

Définitions et généralités

Les récepteurs Toll-like (TLR) sont des Pathogen Recognition Receptors (PRR), une classe de récepteurs jouant un rôle crucial dans le déclenchement de la réponse immunitaire innée. En effet, les PRR sont capables de se lier à des molécules exprimées par des agents pathogènes, des cellules en apoptose ou encore des cellules endommagées (77). Dans le cas des agents pathogènes, ces molécules sont appelées Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP). Les TLR se distinguent des autres PRR par une structure moléculaire et des voies de signalisation propres (MAP kinase, NFkB, IRF, adaptateurs MYD88 et TRIF) (78). Chez les bovins, la famille des TLR compte au moins dix représentants différents (79). À titre de comparaison, dix et treize récepteurs ont été découverts chez l'Homme et la souris, respectivement (80).

Les TLR sont des récepteurs membranaires pouvant se localiser à la surface (membrane plasmique) ou dans le cytoplasme (membrane des endosomes) des cellules (78). Les TLR situés en surface permettent de détecter les agents pathogènes présents dans le milieu extracellulaire tandis que les TLR intracellulaires assurent la détection des agents présents dans les cellules après phagocytose, endocytose clathrine dépendante ou macropinocytose (81). Ils sont exprimés par les macrophages (82), les cellules dendritiques (CD) (82), les LB (83), les cellules stromales et certaines cellules épithéliales (84). L'engagement d'un TLR entraîne l'activation et la maturation de la cellule, et d'autres phénomènes tels que la sécrétion de cytokines (85).

Les TLR se lient de façon relativement spécifique à leurs PAMP, seuls les TLR susceptibles de se lier aux *stimuli* utilisés dans l'étude seront présentés, à savoir : TLR2, TLR4 et TLR7.

TLR2

Le TLR2 forme des hétérodimères avec le TLR1 ou le TLR6 (86). Ces hétérodimères sont localisés sur la membrane plasmique des macrophages et des CD (82). Ils

sont activés par divers ligands tels que l'acide lipotéichoïque et des lipoprotéines (sous forme diacyl ou triacyl) (87,88), très abondants dans la paroi des bactéries GRAM+ (89,90) telles que *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus uberis*. Les TLR peuvent être activés par des ligands synthétiques comme le fibroblast-stimulating lipopeptide 1 (FSL-1), une lipoprotéine reconnue par l'hétérodimère TLR2/6 (91).

TLR4

À la différence de TLR2, TLR4 forme des homodimères (92). Il est principalement exprimé par les macrophages (93) et les CD (94). Les homodimères de TLR4 sont capables de se lier au lipopolysaccharide (LPS), principal constituant de la membrane externe des bactéries GRAM- telles que *Escherichia coli* (95).

TLR7

Les TLR7 sont des récepteurs intracellulaires localisés sur la membrane des endosomes (96). Ils forment des homodimères pouvant se lier aux acides ribonucléiques à simple brin (ARNs), supports génétiques de nombreux virus (97). TLR7 peut être activé par l'imidazoquinoline et ses dérivés synthétiques (98) tels que gardiquimod (GDQ) (99). Ils sont principalement exprimés par les CD (100), les LB (101) et les granulocytes éosinophiles (GNE) (102).

Communication intercellulaire au sein du système immunitaire : les cytokines et chimiokines

Définitions et propriétés

Les cytokines sont des molécules de nature protéique (protéines, peptides et glycoprotéines) et jouent un rôle de messenger intercellulaire. Elles sont chargées de médier et de contrôler la réponse immunitaire, l'inflammation et l'hématopoïèse (103). Elles sont sécrétées par les cellules immunitaires (principalement les macrophages et les LT) mais aussi par des cellules non immunitaires (cellules endothéliales, fibroblastes et cellules mésenchymateuses) (103). Elles ont la particularité de présenter une très forte affinité pour leurs récepteurs. Ainsi, des sécrétions picomolaires de cytokines

suffisent pour induire un effet biologique. Elles peuvent avoir un mode d'action autocrine (action sur la cellule sécrétrice elle-même), paracrine (action locale) et endocrine (action à distance) (103,104). Les chimiokines se distinguent des cytokines *sensu stricto* par leur effet chimiotactique (attraction de certaines cellules) (105). Par souci de concision, le terme « cytokines » désignera à la fois les cytokines et les chimiokines dans la suite du texte.

Comme toutes les molécules de nature protéique, les cytokines sont synthétisées à partir d'acides ribonucléiques messagers (ARNm) via le réticulum endoplasmique rugueux pour celles qui seront sécrétées ou resteront liées à la membrane plasmique, ou via les ribosomes pour celles qui auront une action intracellulaire. De plus, certaines d'entre elles subiront une glycosylation dans l'appareil de Golgi. Enfin, les cytokines sont libérées dans le milieu extracellulaire par exocytose régulée ou constitutive (106).

Classification et fonctions des cytokines

Il existe cinq familles de cytokines :

- les interleukines,
- les chimiokines,
- les colony-stimulating factor (CSF),
- les interférons,
- les transforming growth factor (TGF) et les tumor necrosis factor (TNF).

Les cytokines d'une même famille sont structurellement proches mais peuvent avoir des fonctions très différentes.

Chez les bovins, de nombreuses cytokines sont impliquées dans la réponse immunitaire. Le dosage de l'ensemble de ces cytokines n'étant pas envisageable, quinze d'entre elles ont été sélectionnées de façon à pouvoir investiguer les réponses immunitaires innée et adaptative. Il s'agit des cytokines suivantes : interleukine 1 α (IL-1 α), interleukine 1 β (IL-1 β), interleukine 1RA (IL-1RA), interleukine 6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukine 2 (IL-2), interleukine 4 (IL-4), interleukine 10 (IL-10), interféron γ (IFN- γ), interleukine 17A (IL-17A), chimiokine (C-C motif)

ligand 2 (CCL2) (anciennement MCP-1), chimiokine (C-C motif) ligand 3 (CCL3) (anciennement MIP-1a), chimiokine (C-C motif) ligand 4 (CCL4) (anciennement MIP-1b), chimiokine (C-X-C motif) ligand 8 (CXCL8) (anciennement IL-8) et chimiokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10) (anciennement IP-10).

Cytokines impliquées dans la réponse immunitaire innée

L'IL-1 α est principalement sécrétée par les macrophages. Elle provoque la fièvre et active les LT ainsi que les macrophages (107).

À l'instar de l'IL-1 α , l'IL-1 β est sécrétée par les macrophages (108) et induit des effets similaires (107).

L'IL-1RA est produite par les monocytes, les macrophages et les GNN. Il s'agit d'un inhibiteur compétitif des IL-1 α et IL-1 β et a donc un effet anti-inflammatoire (109).

L'IL-6 est sécrétée par les LT (110), LB, macrophages (111) et cellules endothéliales (112). Elle initie la multiplication et la différenciation des LT et LB (110), ainsi que la production des protéines de la phase aiguë de l'inflammation par le foie (113). Elle possède également une action pyrogène (114).

Le TNF- α est sécrété par les cellules NK (115), les LT (116) et, principalement, les macrophages (117). Elle initie la réponse inflammatoire (118) et l'activation endothéliale² (119).

Cytokines impliquées dans la réponse immunitaire adaptative

L'IL-2 provient des lymphocytes T-helper de type 1 (LTH1) (120) et stimule la prolifération des LT et leur différenciation (121).

L'IL-4 est principalement sécrétée par les lymphocytes T-helper de type 2 (LTH2) et les mastocytes (122). Cette cytokine permet l'activation des LB et les oriente vers la production de certains isotypes d'immunoglobulines (IgG1, immunoglobulines E (IgE)) (122). L'IL-4 induit aussi la différenciation des lymphocytes T-helper naïfs (LTH naïfs) en LTH2 (122).

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire dont les sources principales sont les macrophages, les cellules dendritiques, les LT et les LB (123). Son effet anti-

2. L'activation endothéliale se traduit par la synthèse de monoxyde d'azote par les cellules endothéliales. Cette molécule provoque une vasodilatation et une diminution de la cohésion des cellules endothéliales favorisant la diapédèse des leucocytes.

inflammatoire s'exerce en inhibant l'activité des macrophages, des LTH1 et des cellules NK (123).

L'IFN- γ est principalement produit par les LT et les cellules NK (124). Cette cytokine joue un rôle majeur dans l'activation des macrophages, l'augmentation de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), la commutation de classe vers les IgG et l'inhibition de l'activité des lymphocytes T-helper de type 17 (LTH17) et LTH2 (124).

L'IL-17A est fortement impliquée dans le recrutement des GNN (125). Elle est principalement produite par les LTH17, les LTC et les cellules NK (125). Elle induit la sécrétion de cytokines par les cellules épithéliales, endothéliales et les fibroblastes (125).

Chimiokines

CCL2 est une chimiokine ayant un pouvoir attracteur sur les LTH (plus marqué sur les LTH2), les monocytes, les granulocytes basophiles (GNB), les cellules dendritiques immatures et les cellules NK (126).

CCL3 attire les mêmes cellules immunitaires que CCL2 avec, en plus, une action sur les macrophages (127), les GNE (127), les astrocytes (128), les fibroblastes (127) et les ostéoclastes (127). Cependant, à la différence de CCL2, CCL3 attire davantage les LTH1 que les LTH2 (127).

De même, CCL4 exerce sa chimio-attraction sur les mêmes cellules que CCL3, à l'exception des GNN, des astrocytes et des ostéoclastes. En revanche, CCL4 attire les LB (129,130).

CXCL8 attire les GNN, les GNB, les monocytes, les mastocytes, les cellules NK et certains LTC (131). Cette chimiokine agit sur les cellules endothéliales (en favorisant l'angiogenèse) (131).

Enfin, CXCL10 exerce son effet sur les LTH (plus marqué sur les LTH1), les cellules NK, les LB et agit également sur les cellules endothéliales (132).

Cytokines et polarisation de la réponse immunitaire adaptative (133)

La polarisation de la réponse immunitaire adaptative est gouvernée par la différenciation des LTH naïfs. En fonction de leur environnement cytokinique, les LTH naïfs peuvent se différencier en LTH de type 1, 2 et 3 principalement (134).

Réponse de type 1

La réponse de type 1 désigne l'ensemble des mécanismes de la réponse immunitaire adaptative permettant l'élimination des agents pathogènes intracellulaires (virus, certaines bactéries et protozoaires), en particulier ceux capables de survivre au sein des macrophages (135).

En cas d'infection virale, les LTH1 vont activer les LTC et stimuler la production d'IgG pouvant neutraliser les particules virales et marquer les cellules infectées (135). Les infections par des bactéries intracellulaires impliquent des effecteurs différents. En effet, les LTH1 vont activer les macrophages (135). Cette activation se traduit par une augmentation de l'activité bactéricide de ces derniers (production de dérivés réactifs de l'oxygène) et par la sécrétion de $\text{TNF-}\alpha$ (stimulation des autres macrophages) (136). La principale cytokine initiant leur activation est l' $\text{IFN-}\gamma$ (135). Cette dernière est sécrétée par les LTH1 lorsqu'un macrophage leur présente un antigène porté par une molécule du CMH II (135). Les LTC sont également capables d'activer les macrophages en sécrétant de l' $\text{IFN-}\gamma$ mais, à la différence des LTH1, ils interagissent avec les molécules du CMH I (137). Une fois activés, les macrophages ou les CD produisent également de l'interleukine 12 (IL-12) (138). En présence de cette cytokine, les LTH1 sécrètent de l' $\text{IFN-}\gamma$ initiant la différenciation des LTH naïfs en LTH1 et activant l'activité cytotoxique des LT8 (139).

Les LTH1 jouent aussi un rôle important dans la prolifération et le recrutement des macrophages (135). En effet, la sécrétion d'interleukine 3 (IL-3) et de granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) stimule la production de monocytes par la moelle osseuse (140,141). En induisant la sécrétion de CCL2, les LTH1 vont attirer indirectement les monocytes vers le site infectieux (142). Une fois celui-ci atteint, les monocytes se différencient en macrophages (143).

Enfin, si une infection devient chronique, les macrophages et les LTH1 s'organisent pour former un granulome. Ce dernier permet de circonscrire une infection causée

par un agent pathogène capable de persister dans les macrophages tel que les mycobactéries (144).

Réponse de type 2

La réponse de type 2 est principalement impliquée dans l'élimination des helminthes (135). Elle débute généralement avec une présentation de l'antigène par les CD aux LT4 naïfs dans les nœuds lymphatiques (145). En présence d'IL-4, les LTH naïfs vont se différencier en LTH2 (145). Les LTH2 migrent ensuite vers le site d'infestation sous l'action de diverses chimiokines : chimiokine (C-C motif) ligand 11 (CCL11), chimiokine (C-C motif) ligand 24 (CCL24) et chimiokine (C-C motif) ligand 26 (CCL26) (146). Leur sécrétion est assurée par de nombreux types cellulaires et induite par l'IL-4 et l'interleukine 13 (IL-13) (147). Les mêmes chimiokines sont responsables du recrutement des principales cellules effectrices, à savoir les GNE (148) et les GNB (149).

En cas d'infestation, l'élimination des helminthes se fait selon le triptyque suivant : élimination directe des vers par les effecteurs innés, expulsion des vers et réparation des dommages tissulaires (150). L'IL-4 stimule la sécrétion d'IgE qui amorce l'activation des mastocytes, des GNE et des GNB (151). L'expulsion des helminthes est principalement médiée par l'IL-13 (152). En effet, cette cytokine stimule la sécrétion de mucus, la motilité intestinale et la multiplication des cellules épithéliales (153). Sous l'effet combiné de l'IL-4 et de l'IL-13, les macrophages se différencient en macrophages M2 (154). Leur implication est multiple : contraction des cellules musculaires lisses, réparation des tissus endommagés, ADCC et formation de granulomes (150).

Réponse de type 3

La réponse de type 3 permet de lutter contre les infections dues à des bactéries et des champignons extracellulaires (135). Cette réponse immunitaire est orchestrée par les LTH17 et les GNN en sont les effecteurs principaux (135). L'action des LTH17 s'exerce en permanence au niveau de la muqueuse intestinale et permet le contrôle du microbiote intestinal (155). Leur action s'exerce plus ponctuellement lorsque des bactéries et des champignons extracellulaires pathogènes parviennent à franchir les barrières physiques de l'organisme à la faveur d'un traumatisme ou

d'une perméabilité intestinale (156). La différenciation des LTH en LTH17 repose sur les cytokines suivantes : transforming growth factor β (TGF- β), IL-6, interleukine 1 (IL-1) et interleukine 23 (IL-23) (157,158). Les LTH17 sécrètent de l'IL-17A et de l'interleukine 22 (IL-22) lorsqu'ils rencontrent un antigène (159). Sous l'effet de l'IL-17A, les cellules épithéliales et les fibroblastes sécrètent de l'IL-6 et du granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) ayant pour conséquences respectives l'amplification de l'activité des LTH17 et la stimulation de la production de GNN par la moelle osseuse (160). L'IL-17A stimule aussi la sécrétion de CXCL8 dont le rôle est d'attirer les GNN vers le site infectieux (160). Ainsi, lorsqu'elle agit seule, l'IL-17A assure le recrutement des GNN. En revanche, lorsqu'elle agit en association avec l'IL-22, l'IL-17A induit la sécrétion de peptides antimicrobiens (action bactéricide) et d'agents chélateurs des métaux (actions bactériostatique et fongistatique) (161).

1.3.2 Etiologie

Plus de 150 espèces et sous-espèces de bactéries ont été identifiées comme agents de mammite (162). Cependant, la majeure partie des cas est causée par seulement quelques espèces (Tableau 1.1). Selon l'épidémiologie des mammites, on distingue deux catégories de germes : ceux causant des mammites dites « contagieuses » et ceux provoquant des mammites dites « environnementales ».

TABLEAU 1.1. : Classification des agents responsables de mammites en fonction de leur principal type épidémiologique (contagieux, environnemental ou mixte) et de leur expression clinique (mineur ou majeur). Les agents pathogènes majeurs sont marqués d'un astérisque.

Agents contagieux	Agents environnementaux	Agents mixtes
<i>Streptococcus agalactiae</i> *	<i>Escherichia coli</i> *	Staphylocoques à coagulase négative
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Klebsiella</i> spp.*	<i>Streptococcus uberis</i> *
<i>Staphylococcus aureus</i> *		
<i>Mycoplasma</i> spp.*		
<i>Corynebacterium</i> spp.		

Les agents des mammites contagieuses se caractérisent par une bonne adaptation à la mamelle. Ainsi, ils peuvent y persister et être transmis indirectement d'une vache à l'autre, principalement lors de la traite. Les principaux représentants de cette catégorie sont *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus* et *Mycoplasma* spp (163). Ces bactéries se distinguent les unes des autres par leur contagiosité relative ainsi que la sévérité et la durée des mammites qu'elles provoquent. *S. agalactiae* en est sans doute le représentant le plus typique : il est incapable de survivre dans l'environnement, présente une forte contagiosité et provoque des mammites cliniques légères (164). *S. aureus* est l'agent de mammites contagieuses le plus commun : il provoque souvent des mammites chroniques ce qui le rend difficile à soigner (165). *S. dysgalactiae* est relativement contagieux et est capable de survivre dans l'environnement contrairement aux deux agents précédents (166).

Les mammites à réservoir environnemental sont causées par des agents opportunistes. Bien que des cas de transmission entre vaches aient été rapportés, ces agents sont rarement capables de persister dans la mamelle. En revanche, ils sont capables de survivre, voire se multiplier pour certains, dans le milieu extérieur (167,168). Les principales bactéries rencontrées dans cette catégorie de mammites sont des Enterobacteriaceae, principalement *Escherichia coli*, et un streptocoque, *Streptococcus uberis* (169). Les coliformes sont fréquemment à l'origine de mammites sévères suite à la libération d'endotoxines, dont le LPS (169).

Bien qu'elle soit pratique, cette dichotomie des agents de mammites ne reflète pas parfaitement la réalité. En effet, tous les intermédiaires entre les deux modèles épidémiologiques sont possibles, et ce, pour des souches d'une même espèce. Par exemple, certains isolats de *S. uberis* sont capables de causer des mammites chroniques (170,171). De même, certaines souches d'*E. coli* peuvent persister à l'intérieur des cellules épithéliales mammaires (172–174) et provoquer des épisodes cliniques récurrents (175). A l'inverse, certaines souches de *S. aureus* ont un comportement environnemental (176). Ainsi, le profil épidémiologique d'une mammite ne permet pas d'en déterminer l'agent étiologique.

Finalement, le type de mammite induit par un agent pathogène découle de quatre caractéristiques : sa capacité de survie dans l'environnement, sa vitesse de multiplication dans la mamelle, sa capacité à y persister et la taille de l'inoculum nécessaire pour initier un cas. Ce dernier paramètre n'est pas connu avec certitude mais il serait de l'ordre de la centaine, voire de la dizaine, d'unités formant colonie d'après les modèles infectieux de mammite (177).

Les agents de mammite peuvent encore être subdivisés en agents pathogènes mineurs et majeurs. Les agents pathogènes mineurs induisent une réponse immunitaire légère et rarement des signes cliniques (178). Parmi ces agents, on trouve *Corynebacterium* spp. et certains staphylocoques à coagulase négative (178). Ce sont des bactéries commensales de la peau et du canal du trayon. A l'opposé, les agents pathogènes majeurs provoquent des mammites cliniques de sévérité variable. *S. agalactiae*, *S. aureus*, *M. bovis*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *E. coli* et *Klebsiella* spp. en sont les représentants majeurs (179).

1.3.3 Mesures de maîtrise et de prévention

Les mesures de maîtrise et de prévention ont pour objectif de minimiser la prévalence et la sévérité des mammites. Les deux leviers permettant de réduire la prévalence sont le nombre de nouveaux cas, c'est-à-dire l'incidence, et la durée des infections. Bien qu'elle permette de réduire l'incidence des mammites contagieuses en limitant la pression d'infection, la réduction de la durée des infections n'est qu'une stratégie à court terme. En effet, sans la mise en place de mesures permettant de réduire l'incidence, la baisse de la prévalence repose essentiellement sur le recours aux traitements antibiotiques. Cette baisse s'obtient donc à un coût élevé. Prévenir les nouvelles infections est donc un objectif prioritaire.

Le traitement des mammites en cours de lactation, en particulier celles provoquées par des germes adaptés à la mamelle, est souvent difficile. Pour les mammites subcliniques, la probabilité de succès d'un traitement est généralement meilleure au tarissement, sauf pour les mammites causées par *S. agalactiae* (180–182). La réforme est sans doute la mesure réduisant le plus rapidement la prévalence et

le risque de nouvelle infection. Cependant, il s'agit de la méthode la moins viable économiquement. Le tarissement d'un quartier est également une mesure possible. Elle consiste à identifier les quartiers infectés de façon chronique et à ne plus les traire jusqu'au tarissement. Cette solution est particulièrement intéressante dans les élevages où les possibilités de réforme sont limitées. Le simple tarissement du quartier entraîne sa guérison dans 50% des cas. Le tarissement joue un rôle majeur dans l'épidémiologie des mammites environnementales (Figure 1.1). Plus de 50% des mammites cliniques contractées au cours des 100 premiers jours de lactation font suite à une infection acquise pendant la période sèche (183). Ce constat est renforcé par une autre étude montrant que l'utilisation d'antibiotiques à large spectre au tarissement réduisait le risque de survenue de mammites cliniques dues à un coliforme (184). Paradoxalement, un recours trop fréquent aux antibiotiques peut provoquer une hausse de ces mammites (181). Une solution alternative et efficace est l'usage d'un produit obturateur du canal du trayon (180,181,185,186).

Pour les mammites contagieuses, les pratiques et les équipements de traite sont des facteurs majeurs de transmission des germes d'un quartier ou d'une vache à l'autre. En particulier, un mauvais réglage peut provoquer des lésions du trayon (hyperkératose voire éversion du canal du trayon). Ces lésions dégradent l'efficacité des barrières naturelles du trayon face aux agents pathogènes (187). Paradoxalement, l'hyperkératose légère semble avoir un effet protecteur vis-à-vis des mammites (67,188). Toutefois, le bon fonctionnement des équipements reste préférable pour prévenir les nouvelles infections. La désinfection post-traite (post-trempage ou vaporisation) permet d'éviter la colonisation de la peau du trayon et, par conséquent, de réduire l'entrée de germes dans le canal du trayon avant sa fermeture.

La vaccination peut également contribuer à la prévention des mammites. En Europe, seulement deux vaccins sont disponibles : Startvac[®] (souches J5 d'*E. coli* et SP 140 de *S. aureus* inactivées) et Ubac[®] (acide lipotéichoïque issu du Biofilm Adhesion Component (BAC) de la souche 5616 de *S. uberis*). Plusieurs études rapportent une efficacité limitée. En particulier, d'après l'une d'entre elles, la vaccination contre *E. coli* (vaccin Startvac[®]) ne semble pas diminuer l'incidence des mammites. En

revanche, elle semble réduire les signes cliniques et, par conséquent, les réformes et la mortalité (189).

La prévention passe aussi par la maîtrise des facteurs influençant l'immunité de l'hôte : l'alimentation (carence en vitamine E et sélénium, cétose) (190,191), le stress thermique (192–194), les maladies intercurrentes (fièvre catharrale ovine (FCO) (195), diarrhée bovine virale (BVD) (196) ...).

Sur le long terme, la sélection génétique sur la résistance aux mammites peut avoir un fort impact sur l'incidence des mammites. L'amélioration génétique d'un troupeau peut se faire en réformant les vaches sensibles, en conservant la descendance des vaches saines et en choisissant un taureau possédant de bons index génétiques en relation avec la santé de la mamelle : l'index concentration cellulaire (INCELL), l'index mammite clinique (INMACL) et l'index santé de la mamelle (INSAMA) (197). La sélection des meilleurs taureaux peut diminuer les mammites cliniques de 10 à 20% par génération (198).

Ainsi, en plus du maintien des bonnes pratiques d'hygiène, sélectionner sur la résistance aux maladies semble être la solution la plus prometteuse pour une amélioration durable de la santé. Cette solution est d'autant plus intéressante que la réponse immunitaire pourrait être le point de départ des divers troubles survenant en péripartum.

1.3.4 Interrelations entre activité immunitaire, inflammation et troubles de la santé en péripartum

Le péripartum, période marquant le passage de la fin de gestation à la lactation, se caractérise par d'importants changements physiologiques. Il peut être découpé en deux périodes : le prépartum couvrant les 3 semaines précédant le vêlage et le postpartum s'étendant sur les 3 semaines suivantes. Concentrant 75% des maladies survenant au cours de la lactation, le postpartum est la période idoine pour illustrer les interrelations qui existent entre ces maladies (199). Le paradigme traditionnel veut que la survenue des troubles du postpartum soit la conséquence du déficit énergétique inhérent au début de la lactation. Cependant, dans une revue récente de la

littérature (200), ce paradigme a été remis en question. En effet, l'état inflammatoire résultant de l'activation du système immunitaire suite au vêlage et au début de la lactation, pourrait accentuer le déficit énergétique postpartum et/ou être un facteur de risque direct des troubles de la santé.

1.3.4.1. Paradigme traditionnel

En début de lactation, la capacité d'ingestion des vaches laitières est insuffisante pour couvrir les besoins de production. Ce déséquilibre induit un bilan énergétique négatif (BEN) (201) à l'origine d'une cétose de type I. Le BEN atteint son maximum au cours des dix premiers jours de lactation et disparaît entre 30 et 100 jours postpartum (202,203). De nombreuses études ont mis en évidence une association entre la hausse des concentrations sanguines des acides gras non estérifiés (AGNE) et des corps cétoniques, et la survenue de troubles métaboliques et infectieux au cours du péripartum : stéatose hépatique, déplacement de la caillette, rétention des annexes fœtales, mammite et métrite (204–214). Le péripartum est généralement associé à une immunodépression caractérisée par une diminution de la capacité phagocytaire des GNN, de la blastogenèse lymphocytaire, de la sécrétion d'anticorps, de l'activité du système du complément et de la concentration sanguine de lysozyme (211,215–218). Des travaux conduits sur des leucocytes exposés à des concentrations croissantes d'AGNE et de β -hydroxybutyrate (BHB) ont rapporté une diminution de l'explosion oxydative des GNN (74,219–221) et de la sécrétion d'anticorps par les LB (222). D'autres études menées sur des vaches présentant des concentrations plasmatiques élevées en AGNE et en corps cétoniques ont démontré une diminution du chimiotactisme et de l'activité myéloperoxydase des GNN (223,224). Ainsi, les AGNE et les corps cétoniques semblent avoir un effet immunodépresseur. Cet effet est certainement à l'origine du paradigme traditionnel selon lequel les maladies dont l'incidence augmente au cours du péripartum sont la conséquence de la hausse des concentrations en AGNE et/ou en corps cétoniques (205,225–236). L'hypocalcémie fait également partie des causes incriminées dans ce paradigme (206,226–228,231–233,236).

Ce paradigme repose sur de nombreuses études d'association et non sur la démonstration d'une relation de causalité ; en ce sens, elle présente de nombreuses limites. Tout d'abord, la relation entre les AGNE et les corps cétoniques, et la hausse de l'incidence des maladies en péripartum n'est pas absolue puisque plusieurs études ont montré une absence de relation (237–240). De plus, l'effet immunodépresseur des AGNE et des corps cétoniques n'est pas systématiquement rapporté. À titre d'exemple, la prolifération des cellules mononucléées sanguines, la production d'IFN- γ et l'explosion oxydative n'étaient pas altérées par la présence de BHB à des concentrations atteignant 10 mmol.L⁻¹ (221), dans un modèle *in vitro*. Dans une étude similaire, le BHB n'a eu aucun effet sur les fonctions des GNN (223). D'autres travaux ont montré que les AGNE et les corps cétoniques n'étaient pas à l'origine de la baisse d'appétit observée en péripartum. En particulier, une série d'études a démontré qu'une perfusion de BHB n'avait aucun effet négatif sur l'appétit des vaches (241–243) et pouvait même l'augmenter (244,245). Il est également important de noter que l'activation du système immunitaire et l'état inflammatoire inhérents au vêlage (246,247) ont un effet négatif sur l'activité des leucocytes (248,249) et induisent la libération de GNN immatures par la moelle osseuse (250). Ce dernier point constitue un potentiel biais pour les études qui se sont intéressées à l'effet immunosuppresseur des AGNE et des corps cétoniques. Par ailleurs, les vaches ayant des concentrations de BHB sanguin supérieures à 1,2 mmol.L⁻¹, seuil classiquement retenu pour définir la cétose subclinique en race Prim'Holstein, ont des productions laitières significativement supérieures à celles ayant des concentrations plus faibles (251–253). Ces résultats soulignent le caractère partiellement physiologique de la lipomobilisation et de la production de corps cétoniques.

La complémentation avec du propylène glycol, précurseur du glucose via la néoglucogénèse, des vaches en cétose subclinique confirme le caractère physiologique de la cétose dans certaines situations. En effet, des travaux ont montré que l'apport de propylène glycol permettait d'améliorer la production laitière (254–256) tandis que d'autres ne montrent aucun effet bénéfique (257–261). Ces résultats montrent que, dans bien des cas, les vaches en cétose subclinique parviennent à couvrir les besoins de production et d'entretien en utilisant les corps cétoniques comme substrat

énergétique. L'ensemble des éléments composant le paradigme traditionnel sont résumés dans la **Figure 1.2**.

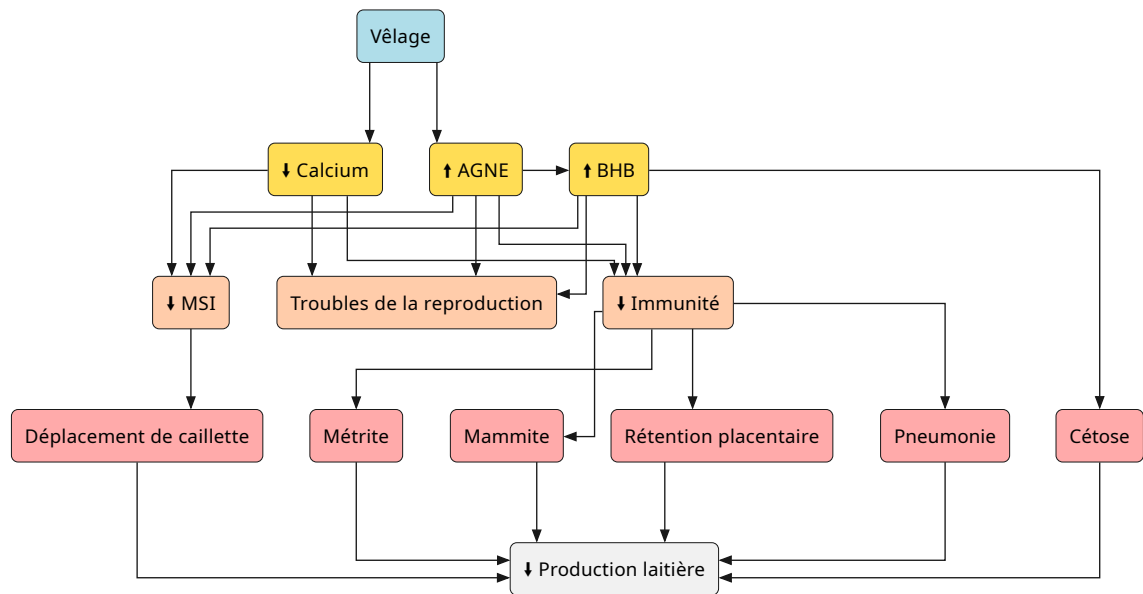


FIGURE 1.2. : Schéma de synthèse du paradigme traditionnel d'après Horst et al., 2020 (200).

En conclusion, bien que de nombreuses études aient mis en évidence une association entre les AGNE, les corps cétoniques et les troubles de santé rencontrés chez la vache laitière en péripartum, ces associations ne sont pas synonymes de relation de causalité et présentent des limites. En réponse à ces interrogations, un nouveau paradigme a récemment été proposé. Ce dernier considère l'activation immunitaire et l'état inflammatoire, inhérents au péripartum, comme le phénomène primordial aux troubles de la santé du péripartum.

1.3.4.2. Nouveau paradigme

Un contexte inflammatoire plus ou moins marqué est présent chez la majeure partie des vaches en péripartum (246,262–264). Le système immunitaire est activé en raison de la libération de PAMP et de Damage-Associated Molecular Pattern (DAMP), molécules endogènes libérées à la suite de dommages cellulaires et mimant l'activité des PAMP (265). Comme présenté précédemment, les PRR, en particulier les TLR, jouent un rôle important dans la reconnaissance des DAMP et des PAMP (266). Ces médiateurs proviennent de trois sources principales : la glande mammaire, l'utérus et le tube digestif.

Comme vu précédemment, l'incidence des mammites est plus élevée en début de période sèche et en péripartum, notamment au moment de la colostrogenèse (Figure 1.1). Lors d'une infection intramammaire par des germes Gram-, le LPS se lie au TLR4 des leucocytes présents dans la mamelle et les active (267). L'atteinte de l'intégrité de l'épithélium mammaire peut être suivie d'une inflammation locale et de la résorption de composés bio-actifs, à l'origine d'une endotoxémie et/ou d'une bactériémie(268).

De même, les métrites, qui apparaissent plus fréquemment à la suite d'une rétention des enveloppes fœtales, peuvent initier une réponse inflammatoire systémique du fait de l'abondance de LPS dans les lochies (269).

Le passage d'une ration de période sèche (classiquement riche en fibres) à une ration de production (classiquement riche en glucides rapidement fermentescibles), parfois sans transition, peut être à l'origine d'une acidose ruminale subaiguë (270). Cette dernière favorise la libération de LPS (271) et augmente la perméabilité intestinale (272,273). Ainsi, des médiateurs comme le LPS peuvent être absorbés et initier une inflammation systémique (271).

De manière générale, les troubles survenant en péripartum sont précédés d'une réponse inflammatoire (274–280).

Selon le modèle *two-hit*, la stéatose hépatique résulte d'une insulino-résistance (*first hit*) à l'origine d'une lipomobilisation massive et d'un stress oxydatif hépatique amplifié par un contexte inflammatoire (*second hit*) (281,282). Plusieurs composantes de la réponse inflammatoire sont impliquées dans ce phénomène. À titre d'exemple, l'administration quotidienne de TNF- α en fin de lactation entraîne une accumulation de triglycérides dans les hépatocytes (283).

En lien avec leur effet phlogogène, les endotoxines peuvent entraîner des troubles de la reproduction. Une expérience a mis en évidence une hausse de l'incidence de la rétention des annexes fœtales suite à l'injection d'endotoxines (284). Sachant que la non-délivrance augmente le risque de métrite (285) et que ces dernières retardent l'involution utérine et la reprise de l'activité ovarienne (286), les endotoxines peuvent être à l'origine d'une baisse des performances de reproduction. Par ailleurs, il a été démontré qu'une inflammation à distance, telle qu'une mammite, pouvait affecter la

maturation folliculaire (287,288). Cet effet peut s'expliquer par les perturbations de l'axe hypothalamo-hypophysaire induites par les endotoxines (289,290).

Une inflammation peut, à elle seule, induire une baisse de la matière sèche ingérée (MSI) en raison du pouvoir anorexigène des médiateurs de l'inflammation (291). Dans le cadre du péripartum, cet effet des médiateurs inflammatoires peut donc expliquer la baisse de la MSI durant cette période (292). Ces observations sont corroborées par l'élévation des concentrations de LPS, de cytokines, de protéines de la phase aiguë (PPA) et d'acide lactique précédant la détection d'une cétose au cours du postpartum (274,280). Par ailleurs, une étude a relevé une association entre une hausse des concentrations en haptoglobine et une réduction de la MSI en amont de la mise bas (293).

Pour ce qui est du déplacement de la caillette, l'état inflammatoire peut augmenter son incidence. En effet, il a été montré expérimentalement que l'administration répétée de LPS augmentait l'incidence de ce déplacement (284).

L'ensemble des éléments en faveur de ce nouveau paradigme est schématisé dans la **Figure 1.3**

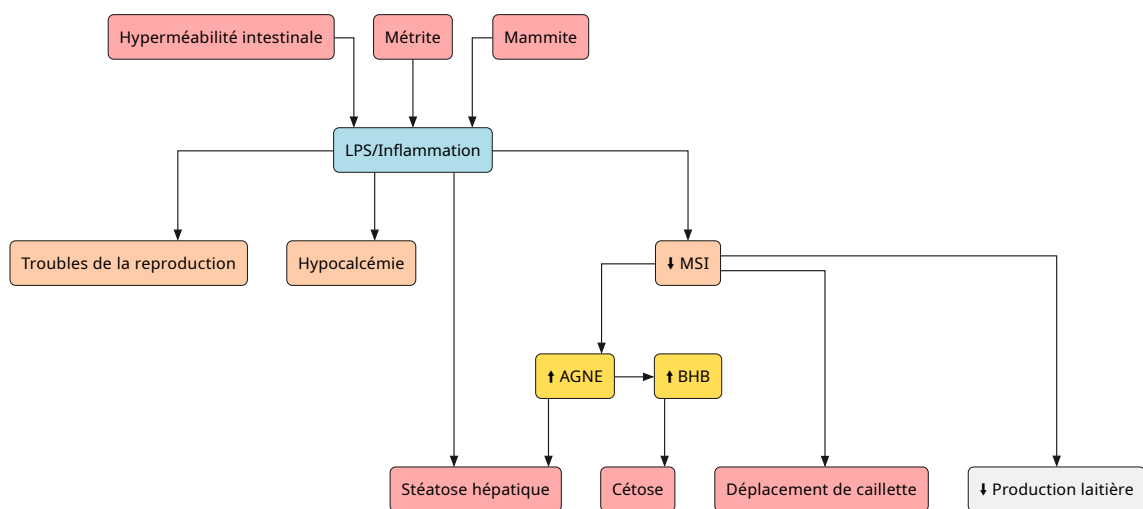


FIGURE 1.3. : Schéma de synthèse du nouveau paradigme d'après Horst et al., 2020 (200).

En résumé, le nouveau paradigme fait l'hypothèse que l'état inflammatoire survenant en péripartum induit une diminution de la quantité de matière sèche ingérée, amplifiant le déficit énergétique, la lipomobilisation et, en conséquence, la hausse des concentrations sanguines en AGNE et en corps cétoniques.

Afin d'améliorer la santé mammaire au moyen de la sélection génétique, il est nécessaire de définir des caractères corrélés aux mécanismes biologiques gouvernant les phénotypes d'intérêt, héritables et dont la mesure est possible chez un grand nombre d'animaux, le plus précocement possible pour un coût réduit (20). L'immunité étant une composante essentielle de la maîtrise des mammites, définir des caractères permettant d'évaluer la réponse de l'hôte apparaît, dans ce cadre, essentiel.

1.4 Biomarqueurs et évaluation de la compétence immunitaire

1.4.1 Biomarqueurs

1.4.1.1. Définition et généralités

Le mot « biomarqueur » est un mot-valise signifiant « marqueur biologique ». Dans le glossaire de la BEST (Biomarkers, EndPointS, and other Tools) Resource (BEST) (294), le groupe de travail sur les biomarqueurs de la *US Food and Drug Administration/National Institutes of Health* (FDA/NIH) définit un biomarqueur comme « une caractéristique mesurable et utilisable comme un indicateur d'un processus biologique normal, d'un processus pathogénique, ou une réponse biologique à une exposition ou une intervention, notamment thérapeutique ». Bien que cette définition soit initialement destinée à la santé humaine, elle s'applique également à la santé animale (295). Les biomarqueurs peuvent être classés en sept catégories (294) :

1. Les biomarqueurs diagnostiques : détecter ou confirmer la présence d'une maladie ou d'un état de santé d'intérêt, ou encore identifier les individus touchés par le sous-type d'une maladie ;
2. Les biomarqueurs de surveillance : évaluer le stade d'une maladie ou d'un état de santé ou mettre en évidence l'exposition à un produit médical ou un agent environnemental (mesure longitudinale) ;

3. Les biomarqueurs pharmacodynamiques ou de réponse : mettre en évidence une réponse biologique chez un individu exposé à un produit médical ou un agent environnemental ;
4. Les biomarqueurs prédictifs : identifier des individus chez lesquels, une fois exposés à un produit médical ou un agent environnemental, la survenue d'un effet favorable ou défavorable est plus probable que chez des individus similaires ;
5. Les biomarqueurs pronostiques : identifier la probabilité de survenue d'un événement clinique, d'une récurrence de maladie ou de progression chez un patient souffrant de la maladie ou de l'état de santé d'intérêt ;
6. Les biomarqueurs de sécurité : indiquer la probabilité, la présence ou l'ampleur d'un effet indésirable, avant ou après l'exposition à un produit médical ou un agent environnemental ;
7. Les biomarqueurs de sensibilité ou de risque : indiquer le potentiel de développement d'une maladie ou d'un état de santé chez un individu qui n'exprime pas cliniquement une maladie ou un état de santé.

Ces catégories ne s'excluent pas mutuellement, un biomarqueur peut appartenir à plusieurs d'entre elles. Par exemple, la concentration des cellules somatiques (CCS) du lait peut être utilisée comme un biomarqueur diagnostique ou bien pharmacodynamique.

Les biomarqueurs sont de natures biologiques diverses et variées (acide désoxyribonucléique (ADN), ARNm, peptides/protéines, métabolites, cellules), et sont plus ou moins étroitement associés à une entité pathologique donnée.

1.4.1.2. Biomarqueurs relatifs aux maladies métaboliques, aux mammites et à l'immunité

Chez les vaches laitières, l'usage des biomarqueurs contribue grandement à l'amélioration de la santé, du bien-être animal et de la productivité. Ils occupent donc une place importante dans la gestion globale des troupeaux laitiers, en particulier dans le cadre des maladies métaboliques, des mammites et de l'immunité.

Biomarqueurs du bilan énergétique

Les biomarqueurs métaboliques peuvent être détectés à la fois dans le sang et dans le lait.

Biomarqueurs sanguins

Le BHB et les AGNE sanguins sont sans doute les métabolites les plus couramment utilisés pour évaluer le bilan énergétique en début de lactation chez la vache laitière. Ces deux métabolites reflètent respectivement la β -oxydation des acides gras par le foie et la lipomobilisation. Une élévation de la concentration de ces métabolites est généralement associée à une diminution de la production laitière (209,226,296), une hausse de l'incidence des maladies infectieuses et des troubles de l'immunité (296,297).

Par ailleurs, la concentration de certains marqueurs de l'inflammation tels que le TNF- α , l'haptoglobine et la protéine sérique amyloïde A (SAA), augmente lors d'un déficit énergétique (298).

Biomarqueurs du lait

Tout comme le BHB sanguin, le BHB du lait est également un marqueur du BEN (299). Cependant, sa concentration dans le lait est environ dix fois inférieure à sa concentration plasmatique. Différentes valeurs de référence ont été définies pour détecter les vaches en cétose subclinique. Une valeur de 0,08 mmol.L⁻¹ semble offrir le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité (300).

Le profil en acides gras du lait évolue également avec le statut énergétique (301). Cette évolution est principalement liée à l'origine métabolique de ces derniers. En effet, les acides gras du lait sont issus de quatre sources principales : l'alimentation, la synthèse par le microbiote ruminal, la synthèse par les cellules mammaires et la lipomobilisation (302). La synthèse mammaire étant réduite en cas de BEN, la lipomobilisation contribue davantage à la composition en acides gras du lait (303). Les acides gras issus de cette dernière et de la synthèse mammaire étant respectivement à chaînes longue et courte, la proportion d'acides gras à chaîne longue augmente

dans le lait (304). En particulier, la proportion d'acide oléique, principal acide gras issu de la lipomobilisation (305), est corrélée positivement au BEN (301).

Par ailleurs, le rapport entre le glucose-6-phosphate (G6P) et le glucose libre dans le lait est également un potentiel marqueur du BEN. En effet, des études ont montré l'existence d'une forte corrélation positive ($r^2 = 0,81$) entre ce rapport et les concentrations plasmatiques en AGNE (306).

De même, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), enzyme catalysant la déshydrogénation du G6P (première étape de la voie des pentoses phosphates) est un biomarqueur candidat pour estimer le déficit énergétique des vaches laitières. L'activité de cette enzyme est corrélée positivement à la concentration de G6P dans le lait ($r^2 = 0,68$) et négativement à la quantité de matière sèche ingérée ($r^2 = -0,65$) en début de lactation.

Biomarqueurs de la santé mammaire

Le biomarqueur le plus couramment utilisé pour la détection des mammites est la CCS (307). L'évolution de ce biomarqueur mammaire variant selon les agents pathogènes, leur usage permettrait non seulement de détecter les mammites mais aussi d'identifier les groupes auxquels appartiennent les agents étiologiques (308).

La lactate déshydrogénase (LDH), enzyme cytoplasmique catalysant la transformation réversible du lactate en pyruvate (309), est également un biomarqueur des mammites (310). En effet, bien qu'il s'agisse d'une enzyme cytoplasmique, la LDH peut se retrouver dans le lait selon deux mécanismes principaux : lyse des cellules épithéliales mammaires ou lyse des cellules somatiques (311–313). Ainsi, lors d'une mammité, l'activité enzymatique de la LDH augmente dans le lait.

Des méthodes plus récentes de peptidomique, métabolomique et de protéomique quantitatives ont permis de mettre en évidence des biomarqueurs candidats dans le lait. En particulier, les mammites causées par *S. uberis* modifient les concentrations de peptides dérivés de la caséine, des GlyCAM, de la SAA, des peptides antimicrobiens ou encore de divers métabolites liés à la réponse inflammatoire (314–316). Selon une autre étude (317), les agents de mammité Gram+ ou Gram- peuvent être différenciés via les molécules suivantes : l' α 2-macroglobuline, l' α 2-antitrypsine, l'haptoglobine, la

SAA3, le CD14, les calgranulines B et C, la cathepsine C, la vanine-1, les galectine 1 et 3, et le CXCL8.

Biomarqueurs de la réponse immunitaire

Les réponses immunitaires cellulaire et humorale reposent sur un réseau complexe d'effecteurs et de médiateurs. Ces derniers sont autant de biomarqueurs permettant d'évaluer la qualité de la réponse immunitaire.

Comme présenté précédemment, la réponse immunitaire cellulaire implique l'activation et la prolifération de diverses populations de cellules. Parmi celles-ci, les LT4, notamment les LTH1, LTH2, LTH17 et les lymphocytes T régulateurs (LTreg), jouent un rôle essentiel dans la coordination de la réponse immunitaire tandis que les LT8 et les lymphocytes T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$) contribuent à l'élimination des cellules infectées ou anormales via leur activité cytotoxique. La capacité des lymphocytes à répondre à des agents mitogènes (blastogenèse) peut être utilisée comme marqueur d'une éventuelle dépression de la réponse cellulaire (318).

Certaines cytokines sont également des marqueurs de la réponse immunitaire cellulaire. En effet, la production de cytokines telles que l'IFN- γ , l'IL-2, l'IL-4 ou encore l'IL-17A, reflète l'activation et la polarisation de la réponse immunitaire (319). Les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-6 sont, par définition, des marqueurs de la réponse inflammatoire (320). A l'opposé, le dosage des cytokines immunorégulatrices comme le TGF- β et l'IL-10 permettent d'évaluer la capacité d'un organisme à moduler sa réponse immunitaire (319).

Les marqueurs d'activation tels que le CD25 (321) et le CD69 (322), présents sur les lymphocytes T et autres cellules immunitaires, marquent leur état d'activation et leur engagement dans la réponse immunitaire cellulaire. Les molécules d'adhérence comme le CD11a, le CD11b, le CD18 et le CD62L (321) sont essentielles pour le recrutement et la migration des cellules immunitaires vers les sites inflammatoires. De même, les récepteurs des chimiokines tels que CCR5 sont un maillon essentiel du chimiotactisme. Leur expression est le signe d'une inflammation en cours (323).

Les GNN occupent également une place importante dans la réponse immunitaire cellulaire. Leur bon fonctionnement peut être évalué par leur activité phagocy-

taire (215–217) et leur capacité à atteindre un site inflammatoire (chimiotactisme et diapédèse). Cette dernière est dépendante de l'expression de molécules d'adhésion telles que la L-sélectine (CD62L) et le CD18 (324,325).

Ainsi, les biomarqueurs de la réponse immunitaire cellulaire sont nombreux et nous informent sur l'activation, la prolifération, la migration et la capacité fonctionnelle des cellules immunitaires.

La réponse immunitaire humorale chez les vaches laitières implique des interactions complexes entre divers composants solubles. Parmi ces composants, les immunoglobulines, en particulier les IgG, IgM et IgA, sont les biomarqueurs les plus couramment utilisés pour évaluer la réponse immunitaire adaptative, en raison de leur rôle crucial dans la reconnaissance spécifique et la neutralisation des agents pathogènes (211,216,217).

Le système du complément joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire médiée par les anticorps et dans l'élimination des agents pathogènes. Le dosage des composants du complément, tels que les fragments C3 et C4, permet d'évaluer son activité (326).

Les PPA sont des molécules d'origine hépatique ayant une place importante dans la réponse immunitaire et inflammatoire. Elles sont dites « positives » ou « négatives » si leurs concentrations augmentent ou diminuent au cours d'une inflammation. L'haptoglobine, la protéine C-réactive, la SAA, la céruloplasmine ou encore le fibrinogène sont les principales PPA positives chez les bovins (113,327–330). Elles peuvent avoir un rôle opsonisant et neutralisant indirect via l'activation du système du complément (331). Les principaux représentants des PPA négatives sont l'albumine, des enzymes telles que la paraoxonase, et les apolipoprotéines (246,331–333). Le dosage des PPA fournit des informations sur la présence d'une inflammation, composante essentielle de la réponse immunitaire (263,325,334).

Les cytokines sont également un élément essentiel de la réponse immunitaire humorale. Par exemple, l'IL-4 intervient dans la prolifération des lymphocytes B et la production d'anticorps, influençant ainsi l'ampleur et l'efficacité de la réponse immunitaire médiée par les anticorps (335).

Les marqueurs des lymphocytes B, tels que le CD20 (336), fournissent des informations sur leur abondance et leur état d'activation.

Le lysozyme est une enzyme possédant des propriétés bactéricides. Il est présent dans de nombreux fluides biologiques. Une diminution de sa concentration dans le sang est le signe d'une potentielle immunosuppression (337,338).

L'ensemble des biomarqueurs présentés en amont permet d'évaluer la réponse immunitaire humorale chez les vaches laitières. En lien avec les biomarqueurs de la santé mammaire et des maladies métaboliques, ils sont essentiels pour améliorer la résistance aux maladies et mettre en place des interventions ciblées. Certains d'entre eux sont déjà employés pour évaluer la compétence immunitaire des bovins laitiers.

1.4.2 Évaluation de la compétence immunitaire

1.4.2.1. Méthode d'évaluation de la compétence immunitaire : la technologie HIR

Différentes méthodes d'évaluation de la compétence immunitaire ont été développées. Certains protocoles s'appuient sur une immunisation préalable des animaux ; ils évaluent donc la réponse immunitaire adaptative (339,340). Ces méthodes ne diffèrent que par leurs populations d'étude et les antigènes employés. Elles permettent de classer les vaches en faibles, moyennes et fortes répondeuses pour les composantes cellulaire et humorale de la réponse immunitaire. Certaines d'entre elles proposent une classification combinant ces deux composantes. Elles sont basées sur la technologie brevetée HIR développée et utilisée au Canada pour estimer la compétence immunitaire des vaches laitières (47).

Cette technologie a pour objectifs d'identifier les animaux présentant une forte réponse immunitaire à une immunisation avec un antigène modèle. Elle peut être mise en œuvre selon diverses modalités permettant d'évaluer uniquement la réponse immunitaire adaptative humorale ou les deux volets de la réponse immunitaire adaptative. La première modalité de mise en œuvre étant incluse dans la seconde, seule cette dernière sera présentée.

L'évaluation de la réponse adaptative consiste donc à :

1. J0 - Collecter du sang pour le dosage des anticorps par enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) et immuniser les animaux avec des antigènes induisant une réponse immunitaire de type 1 et de type 2 qui sont considérées comme associées à une réponse de type cellulaire ou humorale³ ;
2. J14 - Collecter du sang pour le dosage des anticorps après immunisation, mesurer l'épaisseur du pli cutané et ré-injecter l'antigène de type 1 pour induire une réaction d'hypersensibilité retardée ;
3. J15 ou J16 - Mesurer une seconde fois l'épaisseur du pli cutané.

Les antigènes peuvent être librement choisis par l'opérateur. Toutefois, le brevet suggère l'utilisation des antigènes suivant (341) :

- antigènes induisant une réponse de type 1 : *Mycobacterium bovis* et *Mycobacterium phlei* comme bactéries intracellulaires ; la concanavoline A et la phytohémagglutinine comme substances mitogènes,
- antigènes induisant une réponse de type 2 : l'ovalbumine, le lysozyme de blanc d'œuf, l'albumine sérique humaine ou encore des hématies allospécifiques.

La réponse immunitaire humorale est donc estimée par le biais de la concentration en anticorps contre l'antigène de type 2 tandis que la réponse cellulaire est évaluée via l'intensité de la réponse d'hypersensibilité retardée, elle-même évaluée à travers la différence entre les deux mesures consécutives de l'épaisseur du pli cutané.

La réponse immunitaire globale est évaluée par un index mathématique correspondant à la combinaison linéaire des deux grandeurs précédentes. Les coefficients de cette combinaison permettent à l'opérateur de choisir le poids donné à l'une ou l'autre des deux composantes de la réponse immunitaire. La valeur calculée est ensuite centrée et réduite au sein de la population d'étude pour obtenir l'index final. Les individus ayant un index supérieur à 1 sont classés parmi les forts répondeurs tandis que les individus ayant un index inférieur à -1 sont classés parmi les faibles répondeurs, ceux restants étant classés parmi les répondeurs moyens.

3. Cette association entre les réponses immunitaires de type 1 et 2, et les types cellulaire ou humoral ne fait pas consensus dans la communauté scientifique.

1.4.2.2. Compétence immunitaire et troubles de la santé et de la production

Plusieurs études ont étudié le lien entre la compétence immunitaire, évaluée par la méthode HIR, et différents caractères phénotypiques. L'une d'entre elles a étudié l'évolution des compétences immunitaires cellulaire et humorale en fonction de l'âge et de la gestation (342). Celle-ci a mis en évidence une augmentation de la réponse de type 1 jusqu'à 10 mois d'âge puis une réponse de type 2 croissante avec l'âge et la durée de la gestation. Les compétences immunitaires cellulaire et humorale semblent être principalement corrélées aux proportions de $LT\gamma\delta$ et de LB périphériques, respectivement (343). Par ailleurs, les individus ayant une réponse humorale élevée semblent avoir une plus faible incidence de mammites et une meilleure réponse au vaccin contenant *E. coli* J5 (344).

Une étude s'intéressant au lien entre compétence immunitaire globale et mammites rapporte des incidences de mammites plus élevées chez les vaches ayant une réponse immunitaire moyenne que celles ayant une réponse forte (345). Les faibles répondeuses ont également tendance à avoir une incidence de mammites plus élevée que les fortes répondeuses bien que cette différence ne soit pas significative (345). De même, une seconde étude rapporte respectivement 30,7, 27,9 et 17,1 cas de mammite pour 100 vaches-année chez les faibles, moyennes et fortes répondeuses (346). Cette même étude précise que les cas étaient plus sévères chez les faibles répondeuses. Toujours d'après la même étude, il ne semble pas y avoir de relation entre l'incidence des métrites, de la cétose et la compétence immunitaire. En revanche, les individus faiblement répondeurs sont davantage sujets au déplacement de caillette et à la non-délivrance (346).

Concernant les performances de reproduction, il existe une relation favorable entre la compétence immunitaire et le nombre d'IA pour obtenir une IA fécondante (51).

Enfin, la relation entre la production laitière et la compétence immunitaire varie selon le rang de parité. En effet, chez les multipares, la production laitière augmente avec la compétence immunitaire tandis que la relation inverse est observée chez les primipares (347).

Finalement, étant donné les différentes relations présentées précédemment, la sélection sur la compétence immunitaire, telle qu'évaluée par la méthode HIR, semble

pertinente pour améliorer la santé des vaches laitières. Cependant, la méthode HIR présente un certain nombre de limites. Tout d'abord, l'évaluation de la compétence immunitaire *in vivo* par le biais d'une immunisation nécessite d'intervenir plusieurs fois sur les animaux, limite le nombre d'antigènes administrés simultanément et restreint la compétence immunitaire à son volet adaptatif. De plus, soumettre des animaux à une immunisation sans objectif sanitaire soulève des questions d'éthique et de bien-être animal. Enfin, la réponse immunitaire cellulaire est restreinte à une réaction d'hypersensibilité retardée. Toutefois, vu les résultats encourageant de la technologie HIR, il paraît opportun de développer une méthode d'évaluation de la compétence immunitaire permettant de s'affranchir de ces limites et utilisable à grande échelle.

Étude expérimentale

2.1 Objectifs scientifiques, question de recherche et stratégie de l'étude

Comme nous l'avons vu précédemment, en réponse à la demande croissante en produits laitiers, les programmes de sélection génétique des vaches laitières se sont focalisés initialement sur des caractères de production. Ces derniers étant corrélés négativement aux caractères fonctionnels, leur sélection a conduit à une détérioration de la santé des vaches laitières, en particulier la santé mammaire.

L'intégration plus récente de caractères liés à la résistance aux mammites, tels que les CCS et l'incidence des mammites cliniques, devrait permettre d'enrayer cette dégradation. Bien que ces caractères permettent de sélectionner des vaches plus résistantes, ils ne s'intéressent pas directement à leur compétence immunitaire. Des études ont justement tenté de définir de tels indicateurs. Celles-ci s'appuient sur la technologie HIR, utilisée actuellement dans les programmes de sélection canadiens. Bien que cette technologie ait permis de sélectionner des vaches laitières ayant une meilleure compétence immunitaire, elle présente des contraintes limitant son usage à large échelle.

Plus récemment, une méthode d'immunophénotypage standardisée a été développée pour un usage en médecine humaine (348). Elle consiste à doser un panel de cytokines sécrétées en réponse à une stimulation *ex vivo* d'un échantillon de sang total. Le dosage des cytokines est réalisé au moyen de la technologie Luminex[®] xMAP[®]. La stimulation de l'échantillon sanguin est initiée par l'ajout d'un agent pathogène ou d'un ligand spécifique à un PRR donné. Cette méthode a permis de

mettre en évidence, d'une part, une signature cytokinique propre à chaque stimulus et, d'autre part, des groupes phénotypiques parmi la population étudiée.

En comparaison à la technologie HIR, elle présente de nombreux atouts pour évaluer la compétence immunitaire. En effet, en tant que messagers intercellulaires sécrétés par les cellules immunitaires, les cytokines constituent des biomarqueurs de choix pour évaluer les réponses immunitaires innée et adaptative. Cependant, leur pléiotropisme, la redondance de leurs fonctions, leurs synergies et leurs antagonismes impliquent de les doser simultanément pour caractériser assez largement la réponse immunitaire. Cette simultanéité des dosages représentait un réel défi jusqu'à l'arrivée sur le marché des méthodes de multiplexage dont fait partie la technologie Luminex[®] xMAP[®]. Les principes de fonctionnement de cette technologie sont présentés en détail dans l'**Annexe C**.

L'Unité Mixte de Recherche (UMR) Interactions Hôtes-Agents Pathogènes (IHAP) a développé une méthode analogue permettant de cribler la réponse immunitaire des bovins. Les cytokines ont été choisies de façon à couvrir les volets inné et adaptatif de la réponse immunitaire. Les *stimuli* employés sont des agents bactériens de mammites fréquemment rencontrés chez les bovins ainsi que des ligands de TLR (**Figure 2.1**). Les agents de mammites retenus sont *S. aureus*, *S. uberis* et *E. coli*, connus pour activer le TLR2 ou le TLR4. Les ligands des TLR, FSL-1 et LPS, ont été choisis de façon à activer spécifiquement les TLR associés aux agents de mammite sélectionnés. Le troisième et dernier ligand des TLR, GDQ, active spécifiquement le TLR7/8.

En s'appuyant sur cette nouvelle méthode, l'objectif scientifique de ce projet est d'investiguer la diversité de la réponse immunitaire des vaches laitières, en particulier son versant cellulaire, en lien avec le parcours de vie et les performances, l'hypothèse sous-jacente étant qu'il existe des phénotypes immunitaires variables chez la vache laitière. L'ensemble des travaux menés s'est donc attaché à répondre à la question de recherche suivante : quels sont les facteurs qui font varier la réponse des vaches laitières à des tests sanguins ?

Afin de répondre à cette question, la première partie du volet expérimental de cette thèse est consacrée à (i) la validation de la méthode de dosage des cytokines bovines

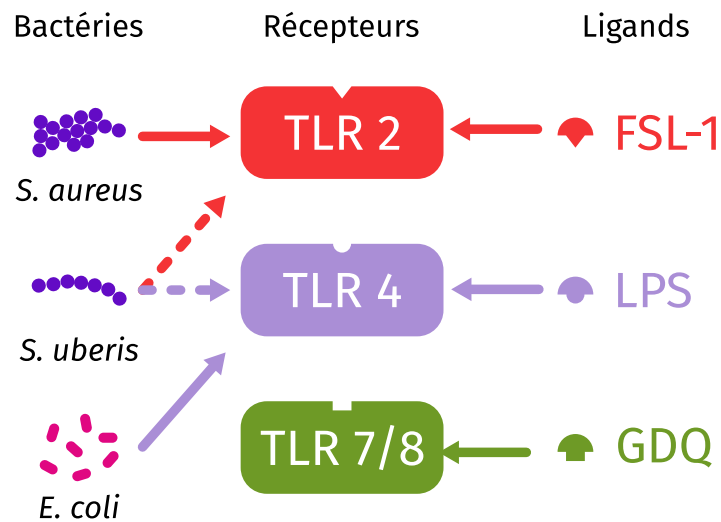


FIGURE 2.1. : Stimuli et TLR associés.

par la technique multiplexe développée par l'UMR IHAP, (ii) la caractérisation de la diversité intra-individuelle de la réponse immunitaire vis-à-vis des divers *stimuli* et à l'identification des principales cytokines les discriminant. La seconde partie vise à identifier les facteurs influençant la réponse à ces stimulations et à investiguer l'existence d'une typologie de la diversité de la réponse interindividuelle induite par un stimulant couramment utilisé, le LPS. La troisième et dernière partie du volet expérimental reprend les principes de la partie précédente en l'étendant de façon synthétique à d'autres *stimuli*.

2.2 Matériels et méthodes généraux

2.2.1 Population d'étude

Les vaches de l'étude sont issues d'une sélection génétique divergente sur la résistance aux mammites, menée dans l'unité expérimentale du Pin (doi : 10.15454/1.5483257052131956E12) de l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE). Les deux lignées sont supposées sensible et résistante aux mammites, et ont été créées à partir de taureaux d'insémination. Les taureaux ont été sélectionnés à partir de leurs INCELL et INMACL, l'INSAMA n'étant pas connu au moment des IA. Selon la moyenne des deux index retenus, les taureaux ont été classés parmi les intervalles $]-\infty; -1]$, $]-1; -0,15]$, $]-0,15; 0,15]$, $]0,15; 1]$ et $]1; +\infty]$ correspondant respectivement à des taureaux très sensibles, sensibles, neutres, résistants et très résistants aux mammites. Un premier lot de femelles a été inséminé avec ces taureaux. Leurs filles ont ensuite été inséminées avec un taureau issu de la même classe que leur père pour amplifier la divergence. L'ensemble des vaches a été génotypé avec la puce EuroG10k (Illumina Inc., San Diego, CA). Chaque vache possède donc sa propre prédiction génomique provenant de l'évaluation nationale.

L'étude a été conduite sur 107 vaches Prim'Holstein ayant un âge moyen de $3,4 \pm 1,0$ ans. Le rang de parité moyen était de $1,9 \pm 0,9$ avec, respectivement, 44, 43 et 20 vaches en premier, deuxième et troisième rang de lactation ou plus. Sur les 107 vaches, 28 étaient gravides (23 ± 18 jours de gestation) au moment de la collecte des échantillons de sang utilisés dans la suite du protocole. Les vaches étaient indemnes de maladies zoonotiques telles que la brucellose ou la tuberculose, et indemnes de leucose bovine enzootique (LBE). Leur statut sanitaire a été évalué minutieusement durant les quatre semaines encadrant les prélèvements sanguins. Seulement quelques troubles mineurs ont été décelés sur cette période : six mammites cliniques, une cystite et un cas de boiterie. Les vaches concernées n'ayant pas présenté des profils cytokiniques divergents, leurs données ont été conservées pour les analyses. Enfin, toutes les vaches ont été conduites en un lot unique et, donc,

exposées aux mêmes facteurs environnementaux. La ration alimentaire distribuée a été constante tout au long de l'expérience avec un accès aux pâtures d'avril à octobre.

2.2.2 Données d'élevage

L'ensemble des données suivantes a été collecté sur chacune des vaches durant la lactation d'échantillonnage : production laitière par traite, composition en matières utiles du lait (taux butyreux (TB) et taux protéique (TP)) bihebdomadaire, BHB et acétone bihebdomadaires par spectrométrie moyen infrarouge (MIR), lactose et urée hebdomadaires et CCS bihebdomadaires. Ces derniers ont été mesurés avec un compteur de cellules somatiques Fossomatic - Model 90 (Foss Food technology, Hille-rod, Denmark). Les CCS ont ensuite été transformés en score de cellules somatiques (SCS) à l'aide de la formule suivante :

$$SCS = \log_2 \left(\frac{CCS}{10^5} \right) + 3 \quad (2.1)$$

En plus de l'INSAMA, l'INMACL et l'INCELL, d'autres index de production, fonctionnels, de morphologie et synthétiques étaient disponibles. Ces derniers sont présentés dans l'**Annexe B**. Pour chacune des vaches, la durée de la lactation, le lait 305 et les dates de vêlage, d'IA et de survenue des événements sanitaires (mammites cliniques, boiteries et autres affections) étaient disponibles.

2.2.3 Collecte, préparation et stimulation des échantillons

Les prélèvements sanguins ont été réalisés à 101 ± 11 jours après le vêlage afin d'éviter la phase de dépression immunitaire qui survient après le vêlage favorisant la survenue de maladies infectieuses (349). Le sang a été directement prélevé à la veine jugulaire avec des seringues de 1,2 mL renfermant des billes recouvertes d'héparine de lithium (16 UI par millilitre de sang) (S-Monovette[®], Sarstedt Marnay, France). Chaque seringue a été remplie au préalable avec un stimulus à la concentration $10 \times$

dans un volume de 200 μ L de RPMI-1640 avec 0,1% de séralbumine bovine et 10 \times d'un mélange de pénicilline et de streptomycine.

Deux catégories de stimulus ont été utilisées : trois bactéries tuées par la chaleur (*heat-killed*) et trois ligands des TLR (Tableau 2.1). Les premières étaient *Escherichia coli* (HKEC), *Staphylococcus aureus* (HKSA) et *Streptococcus uberis* (HKSU) tandis que les seconds étaient le FSL-1, le LPS et GDQ, se liant respectivement aux TLR2/6, 4 et 7/8 chez les bovins. Tous les stimuli proviennent de InvivoGen (Toulouse, France), à l'exception de HKSU qui a été fourni par FB. Gilbert (ISP, INRAE, Nouzilly, France). Cette dernière est une souche HKSU 2211 appartenant au Multilocus Sequence Type (MLST) 6 (complexe clonal 5, un des plus fréquents en Europe (171,350)) isolée à partir d'une mammite clinique. Après avoir été cultivées dans du *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) et dosées par densité optique, les bactéries ont été inactivées par un traitement à 70°C pendant 50 minutes. L'inactivation a été vérifiée par une mise en culture sur une gélose au sang coulée dans une boîte de Petri.

TABLEAU 2.1. : Stimuli auxquels les prélèvements sanguins ont été exposés.

Stimulus	Abréviation	Concentration	Source	Récepteur
Bacteries				
HK <i>Escherichia coli</i> O111 :B4	HKEC	10e7/mL	Invivogen ttrl-hkeb2	complexe
HK <i>Staphylococcus aureus</i>	HKSA	10e7/mL	Invivogen ttrl-hksa	complexe
HK <i>Streptococcus uberis</i>	HKSU	10e7/mL	HM	complexe
MAMPS				
Fibroblast-Stimulating Lipopeptide 1	FSL-1	1 μ g/mL	Invivogen ttrl-fsl	TLR2/6
Imidazoquinoline	GDQ	3 μ g/mL	Invivogen ttrl-gdq-5	TLR7/8
Lipopolysaccharide	LPS	3 μ g/mL	Invivogen ttrl-3pelps	TLR4

La stimulation a commencé dès le prélèvement et les échantillons ont été incubés à 38,5°C (température rectale des adultes de l'espèce *Bos taurus*) pendant 24h. À la fin de la période d'incubation, les tubes ont été centrifugés à 750 g pendant 10

minutes. Le plasma obtenu a été aliquoté dans des plaques de 96 puits et conservé immédiatement à -20°C.

2.2.4 Dosage des cytokines et des chimiokines

2.2.4.1. Dilution des échantillons

Les échantillons de plasma ont été décongelés à 37°C et remis en suspension. Environ 100 μL ont été transférés dans des plaques de 96 puits à fond conique. Ils ont ensuite été centrifugés à 450 g pendant 5 minutes afin de retirer d'éventuels débris. Enfin, 30 μL ont été transférés dans une nouvelle plaque de 96 puits à fond conique et dilués au dixième avec le tampon de dosage.

2.2.4.2. Dosage via le multiplexage à billes

Les concentrations des cytokines ont été déterminées avec le kit Milliplex xMAP[®] développé par notre équipe pour le dosage de 15 cytokines bovines (SPRCUS706, Milliplex[®], xMAP[®], Merck-Millipore, France). Les analytes d'intérêt comprennent cinq cytokines impliquées dans la réponse immunitaire innée (IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-6 et TNF- α), cinq cytokines intervenant dans la réponse immunitaire adaptative (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ et IL-17A) et cinq chimiokines (CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CXCL8 (IL-8) et CXCL10 (IP-10)).

Les dosages ont été réalisés sur onze plaques de 96 puits à six dates différentes par un unique opérateur. Les plaques ont été organisées par lot de deux. Chaque session de dosage portait sur un seul lot. Dans chaque lot, les deux plaques contenaient les échantillons de contrôle haut et bas, fournis avec le kit, mais seulement une des deux plaques contenait la gamme étalon (7 points d'étalonnage). Les échantillons de contrôle et d'étalonnage ont été dosés en duplicata tandis que les échantillons provenant des vaches ont fait l'objet d'une seule mesure chacun.

Chaque plaque a été lavée avec 200 μL de tampon de lavage sous agitation pendant 10 minutes à température ambiante. Pour les étalons et les contrôles, 25 μL de solution contenant les billes (agitée au préalable), 25 μL de solution de contrôle ou d'étalon et 25 μL de sérum matrice ont été versés dans chaque puits (volume

total de 75 μL). Pour les échantillons provenant des vaches, les puits ont été remplis avec 25 μL de solution contenant les billes, 25 μL de tampon de dosage et 25 μL de plasma dilué comme indiqué précédemment. Les plaques ont ensuite été recouvertes d'un film plastique et de papier aluminium avant d'être incubées à 4°C sous agitation (500-700 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$) durant toute une nuit. À la fin de l'incubation, les plaques ont été lavées trois fois avec du tampon de lavage. Afin de maintenir les billes dans les puits, les plaques ont été placées sur un support aimanté pendant une minute avant le retrait du surnageant et la procédure de lavage. Ensuite, 25 μL de solution de détection ont été ajoutés dans chaque puits. Les plaques ont été couvertes de film plastique et incubées sous agitation (500-700 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$) pendant une heure à température ambiante. Pour mettre en évidence les anticorps secondaires, 25 μL d'une solution de conjugué de streptavidine phycoérythrine ont été ajoutés. Les plaques ont ensuite été remises en incubation pendant trente minutes à température ambiante. Après l'incubation, les plaques ont été lavées trois fois selon la même procédure que celle décrite précédemment. Les billes de chaque puits ont été remises en suspension dans 150 μL de liquide de gaine. Enfin, les plaques ont été recouvertes de film plastique et incubées pendant cinq minutes à température ambiante.

2.2.4.3. Acquisition des données

Pour le calcul des Median Fluorescence Intensity (MFI), les intensités de fluorescence ont été capturées à l'aide du système d'acquisition MAGPIX[®] (Luminex[®]) équipé d'un capteur photographique charge-coupled device (CCD). Les données émises par le MAGPIX[®] ont ensuite été traitées avec le logiciel xPONENT[®] (version 4.2.1324.0, Luminex Corp, Austin TX USA).

2.3 Évaluation d'une méthode de profilage des cytokines sur sang entier et caractérisation de la diversité de la réponse immunitaire cellulaire

Cette partie de l'étude a fait l'objet d'une publication parue le 23 mai 2022 dans le journal *Frontiers in immunology*. L'article complet est accessible en page 56. Les paragraphes suivants en font la synthèse.

2.3.1 Contexte, problématique et objectifs

Les cellules immunitaires jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité des organismes vivants (351). La communication entre celles-ci est assurée par des médiateurs solubles, les cytokines. Un dysfonctionnement de cette communication aboutit généralement à une augmentation de la sensibilité d'un individu à des maladies infectieuses, une propension aux états inflammatoires ou encore la survenue de maladies autoimmunes. L'étude des cytokines représente donc un réel enjeu pour la compréhension de nombreux mécanismes physiopathologiques. Étant sécrétées à des concentrations de l'ordre du pg.mL^{-1} , les cytokines requièrent des méthodes de dosage très sensibles et très spécifiques. Bien que l'ELISA réponde à ces critères, il ne permet pas de doser simultanément plusieurs cytokines dans un même échantillon, contrairement aux méthodes de multiplexage à billes telles que la technologie *Luminex*[®]. A cette fin, Merck Millipore a développé un kit de dosage adapté à l'espèce bovine permettant d'investiguer, à la fois, les réponses immunitaires innée et adaptative. Par ailleurs, la stimulation *ex vivo* d'échantillons de sang total a déjà fait ses preuves pour investiguer la réponse immunitaire cellulaire face à un *stimulus*.

Ainsi, cette étude propose (i) une évaluation des performances analytiques du kit de dosage proposé par Merck Millipore, (ii) la définition de profils cytokiniques en réponse à des *stimuli* (trois agents de mammites majeurs et trois ligands des

TLR) et (iii) l'identification des combinaisons minimales de cytokines permettant de discriminer au mieux ces *stimuli*.

2.3.2 Matériels et méthodes

L'ensemble des analyses statistiques a été conduit sur les dosages cytokiniques décrits dans la section 2.2.

2.3.2.1. Validation « pré-étude » de la méthode de dosage

L'évaluation des performances analytiques du kit de dosage a été réalisée sur les MFI brutes (sans soustraction du blanc) (352) selon les étapes recommandées par Findlay *et al.* (353).

La première étape consiste à calibrer les courbes dose-réponse à partir de la gamme d'étalonnage. Les courbes dose-réponse des dosages immunologiques étant sigmoïdes, elles ont été modélisées par des fonctions logistiques à quatre ou cinq paramètres. Le nombre de paramètres a été choisi en comparant les Akaike Information Criterion (AIC) des deux modèles, le modèle retenu étant celui offrant le plus petit AIC. La qualité des ajustements a été appréciée via l'intervalle des valeurs des résidus standardisés et leur normalité. Les paramètres ont été estimés par le biais de l'algorithme de Levenberg-Marquardt pondéré par les MFI moyennes.

La deuxième étape s'intéresse à la justesse des dosages, objectivée par le taux de récupération, et la précision, estimée par le coefficient de variation (CV).

La troisième et dernière étape vise à définir les limites de quantification. Celles-ci ont été estimées à partir des CV.

Ces étapes ont été effectuées pour chaque cytokine.

2.3.2.2. Discrimination des *stimuli*

La capacité de la méthode de multiplexage à distinguer les différents *stimuli* a été investiguée au moyen d'une Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) *multilevel*. La PLS-DA classique est un algorithme de *machine learning* supervisé réalisant une réduction de dimension. Les nouvelles composantes sont construites de

façon à maximiser la covariance entre un jeu de variables continues (les cytokines) et une variable discrète (le *stimulus*). Le fait de maximiser la covariance maximise également la distance entre les groupes d'individus associés à chacune des modalités de la variable discrète.

L'approche *multilevel* a été mise en œuvre pour tenir compte de la non-indépendance des mesures induite par le plan d'échantillonnage (répétition de mesures). En effet, cette approche permet de conserver la variabilité intra-individuelle (celle liée à la nature du *stimulus*) tout en éliminant la variabilité interindividuelle (celle liée aux individus).

Les PLS-DA *multilevel* ont été réalisées sur les concentrations des cytokines, les MFI brutes et les MFI ajustées « à la moyenne » selon la méthode proposée par Cohen *et al.* (354). L'ajustement « à la moyenne » consiste à associer un profil type de sécrétion à un niveau moyen de sécrétion et d'évaluer, pour chaque cytokine, la « distance » séparant chaque individu de son profil type. Cette « distance » correspond à la valeur ajustée. Contrairement aux MFI brutes, les MFI ajustées à la moyenne sont des valeurs relatives.

Enfin, les cytokines permettant de discriminer au mieux les *stimuli* ont été identifiées avec une sparse PLS-DA (sPLS-DA), variante de la PLS-DA permettant de faire une sélection de variable en appliquant une pénalisation de lasso.

2.3.3 Résultats

Les performances de la méthode de dosage sont bonnes pour l'ensemble des cytokines, à l'exception de CXCL8, pour sa justesse et sa précision.

Dans toutes les conditions de stimulation, une augmentation de la quantité de cytokines sécrétées a été observée par rapport au contrôle. Les agents de stimulation GDQ et Heat-killed *Streptococcus uberis* (HKSU) ont généré les plus grandes augmentations. Tous *stimuli* confondus, l'IFN- γ et le TNF- α sont les cytokines dont la sécrétion augmente le plus tandis que CCL2, IL-2, IL-4 et IL-6 sont celles dont la sécrétion augmente le moins.

Les *stimuli* bactériens sont associés à une augmentation de la sécrétion d'IL-1 α , IL-1 β

et TNF- α , des cytokines fréquemment rencontrées dans les états inflammatoires, ainsi que IFN- γ et IL-17A, des cytokines de la réponse immunitaire adaptative.

La PLS-DA *multilevel* conduite sur les MFI ajustées a permis de discriminer correctement les *stimuli* bactériens (taux de mauvaise classification de 1,5% sur les deux premières composantes). L'IFN- γ , TNF- α , IL-1 α , IL-1 β et CXCL8 étaient les cytokines les plus discriminantes, HKSU se distinguant de Heat-killed Escherichia coli (HKEC) et Heat-killed Staphylococcus aureus (HKSA) par des niveaux plus élevés d'IFN- γ , TNF- α et IL-1 α , et un niveau plus faible de CXCL8. HKSA se distingue des deux autres *stimuli* bactériens par des sécrétions plus faibles d'IL-1 α et IL-1 β .

D'après les résultats de la sPLS-DA, l'IFN- γ , l'IL-1 β et le TNF- α suffisent pour discriminer correctement les trois *stimuli* bactériens (taux de mauvaise classification de 5,6% et de 1,6% sur les deux et trois premières composantes, respectivement).

Concernant les ligands TLR, la PLS-DA *multilevel* présente un pouvoir discriminant plus faible que pour les bactéries (taux de mauvaise classification de 10,2 et 6,8% sur les deux et trois premières composantes respectivement). GDQ se distingue clairement du LPS et FSL-1 par des sécrétions plus élevées de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β et CXCL10, et plus basses en CXCL8 et CCL3. LPS présente des valeurs plus élevées en IL-6 et plus basses en IL-1 β que FSL-1. La sPLS-DA a montré que le TNF- α et l'IL-6 permettaient de différencier correctement les trois ligands des TLR (taux de mauvaise classification de 8,4% sur les deux premières composantes).

La PLS-DA réalisée sur l'ensemble des *stimuli*, à l'exception de GDQ, a montré que HKEC et LPS, deux *stimuli* connus pour activer le TLR4, présentaient des signatures cytokiniques similaires. Cette similarité n'a pas été retrouvée entre HKSA et FSL-1, censés activer TLR2, et HKSU, LPS et FSL-1, HKSU activant les TLR2 et 4.

Les analyses précédentes ont également été conduites sur les MFI brutes et ont donné des résultats similaires.

2.3.4 Conclusion

Le kit de Merck Millipore développé pour la technologie *Luminex*[®] présente des performances suffisantes pour le dosage de cytokines bovines même si certaines

cytokines telles que CXCL8 et CCL3, mériteraient d'être recalibrées. Toutefois, ces cytokines n'ont pas empêché une bonne discrimination des *stimuli* bactériens par la PLS-DA. La stimulation *ex vivo* d'échantillons de sang total avec les trois agents de mammites (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus uberis*) a permis de mettre en évidence un profil cytokinique propre à chacun d'entre eux. Les cytokines permettant de les discriminer au mieux sont l'IFN- γ , l'IL-1 β et le TNF- α . Cependant, il est important de garder à l'esprit que les stimulations ont été réalisées avec des bactéries tuées par la chaleur. Les réponses cellulaires observées pourraient donc différer de celles causées par des bactéries vivantes. En comparaison à une autre étude (355), la stimulation *ex vivo* immédiatement après le prélèvement présente l'avantage de limiter le nombre de manipulations de l'échantillon et l'activation non spécifique des cellules immunitaires. Ainsi, les valeurs obtenues via cette méthode sont certainement plus proches des valeurs observables *in vivo*. De plus, en permettant le dosage simultané de plusieurs cytokines, le multiplexage à billes offre des mesures plus fiables que celles issues de l'ELISA.

Bien que les PLS-DA réalisées sur les MFI ajustées « à la moyenne » donnent des résultats similaires à ceux obtenus pour les MFI brutes, l'ajustement « à la moyenne » offre une lecture différente des profils cytokiniques. Par ailleurs, en prenant en compte la répétition des mesures, l'approche *multilevel* a permis d'améliorer sensiblement les performances de la PLS-DA. Cette amélioration est révélatrice d'une grande variabilité interindividuelle qui fait l'objet des deux volets suivants de la thèse. Pour finir, cette étude a permis de poser les bases d'un protocole standardisé pour étudier la réponse immunitaire cellulaire chez les bovins laitiers, aussi bien pour la réalisation des dosages cytokiniques que pour leur analyse statistique.



Standardized Whole Blood Assay and Bead-Based Cytokine Profiling Reveal Commonalities and Diversity of the Response to Bacteria and TLR Ligands in Cattle

OPEN ACCESS

Edited by:

Oleh Andrukhov,
University Dental Clinic Vienna, Austria

Reviewed by:

Kieran G. Meade,
University College Dublin, Ireland
Ana Victoria Ibarra-Meneses,
Université de Montréal, Canada

*Correspondence:

Gilles Foucras
gilles.foucras@envt.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Cytokines and Soluble
Mediators in Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 08 February 2022

Accepted: 13 April 2022

Published: 23 May 2022

Citation:

Lesueur J, Walachowski S,
Barbey S, Cebron N, Lefebvre R,
Launay F, Boichard D, Germon P,
Corbiere F and Foucras G (2022)
Standardized Whole Blood
Assay and Bead-Based Cytokine
Profiling Reveal Commonalities
and Diversity of the Response to
Bacteria and TLR Ligands in Cattle.
Front. Immunol. 13:871780.
doi: 10.3389/fimmu.2022.871780

Jérémy Lesueur¹, Sarah Walachowski¹, Sarah Barbey², Nathan Cebron¹,
Rachel Lefebvre³, Frédéric Launay², Didier Boichard³, Pierre Germon⁴,
Fabien Corbiere¹ and Gilles Foucras^{1*}

¹ IHAP, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France, ² Unité Expérimentale du Pin, INRAE, Borculo, Le Pin au Haras, France, ³ GABI, Université de Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Jouy-en-Josas, France, ⁴ ISP, Université de Tours, INRAE, Nouzilly, France

Recent developments in multiplex technologies enable the determination of a large number of soluble proteins such as cytokines in various biological samples. More than a one-by-one determination of the concentration of immune mediators, they permit the establishment of secretion profiles for a more accurate description of conditions related to infectious diseases or vaccination. Cytokine profiling has recently been made available for bovine species with the development of a Luminex[®] technology-based 15-plex assay. Independently from the manufacturer, we evaluated the bovine cytokine/chemokine multiplex assay for limits of detection, recovery rate, and reproducibility. Furthermore, we assessed cytokine secretion in blood samples from 107 cows upon stimulation with heat-killed bacteria and TLR2/4 ligands compared to a null condition. Secretion patterns were analyzed either using the absolute concentration of cytokines or using their relative concentration with respect to the overall secretion level induced by each stimulus. Using Partial Least Square-Discriminant Analysis, we show that the 15-cytokine profile is different under *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus uberis* conditions, and that IFN- γ , IL-1 β , and TNF- α contribute the most to differentiate these conditions. LPS and *E. coli* induced largely overlapping biological responses, but *S. aureus* and *S. uberis* were associated with distinct cytokine profiles than their respective TLR ligands. Finally, results based on adjusted or absolute cytokine levels yielded similar discriminative power, but led to different stimuli-related signatures.

Keywords: cytokine, bead-based assay, cattle, inflammation, bacteria, MAMPs, whole blood stimulation

INTRODUCTION

The last decade has witnessed an increase in the popularity of sequencing-based technologies like genomics and transcriptomics (1, 2). They allow the description of the genome structure and its expression in multiple tissues, organisms, and biological conditions. However, without protein-level information, it may be difficult to interpret the results of receptor–ligand interactions. These interactions are particularly important for certain classes of immune proteins like cytokines, which are a group of small molecules mediating dialogs between cells involved in the functions of the immune system. The fine-tuned regulation of their expression often leads to short ranges of biological variations but strong physiological effects (3), so that their dosage requires highly sensitive and specific methods. These criteria are met by immune-based methods, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which is a common but time-consuming technique due to its low throughput. For high-scale detection and measurement of cytokines, several multiplexing techniques have been developed to determine concentrations in human and laboratory species, like the planar electro-chemiluminescence assay, known as the Mesoscale® technology for its commercial version, or bead-based assay, like the Luminex® technology (4).

Such assays are still scarce in most domestic species like ruminants, for investigating biological situations such as responses to inflammatory conditions, infectious diseases, or vaccination. Ruminants (cattle, goats, and sheep mainly) are of special interest because of the multiple services they provide to humans. However, they may also be sources of zoonotic diseases of public health concern (like tuberculosis, brucellosis, etc.). A central way of keeping good health in ruminant species may be a well-functioning immune system (5). Until recently, the study of their immunity was essentially conducted through serology in serum or milk. Antibody quantification is an easy way to assess exposure or immunity, and it is much more relevant to viruses due to the production of neutralizing antibodies that are the final effectors in clearing the infection. In contrast, for bacteria, antibodies may increase opsonophagocytosis, but neutrophils and macrophages are central to the bactericidal activity. Progress made in understanding the immune responses to pathogens has emphasized the importance of the cell-mediated response, besides the production of immunoglobulins. Activation of the cellular response, with both innate and adaptive arms acting in concert against a pathogen or after contact with microbial-associated molecular patterns (MAMPs), leads to the secretion of various kinds of cytokines. Profiling secretion enables the characterization of a specific response and is informative on the mechanisms mobilized by the organism to fight the pathogen-related disease. This method is already applied for the detection of exposure or chronic infection by some pathogens like *Mycobacterium* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, and *M. bovis*, the causal agents of tuberculosis in humans and cattle, respectively. Screening for the presence of a mycobacterial infection relies on IFN- γ detection, a cytokine released during the cell-mediated response in infected organisms (6), but several other cytokines are also involved in the response to mycobacteria. These might be helpful to differentiate among

the various disease or infection states (7), and thoroughly describe immunity to mycobacteria and its underlying mechanisms, as recently suggested (8). Several attempts were also made to assess bovine innate immunity using whole blood assays (9, 10).

Recent technologies such as the Luminex®, a multiplex bead-based immunoassay platform, meet the criteria for high throughput, sensitivity, and specificity. The technology uses magnetic or polystyrene microscopic beads to bind a specific target analyte. Beads are dyed with a given fluorophore, enabling the identification of the target. A second fluorophore enables us to quantify the amount of analyte bound to each bead. This method allows the quantification of up to 100 different analytes in a single sample. This high-throughput technology provides data at an unusual scale for the description of the cytokine response. Indeed, cytokine profiling is becoming more and more popular, and a recent description of highly perturbed cytokine secretion in patients with COVID-19 (11) or influenza (12) infection shows that the method of data analysis might be improved over the linear description of cytokine changes. Data clustering has been recently proposed to resolve this issue for mining cytokine profiles and ease their biological interpretation. Improved methodology, such as the CytoMod adjustment procedure (13), is required when a comparison of the cytokine profiles is made between several conditions, whether they are health-related conditions or laboratory-based assays.

In this study, we describe the assessment of the response to different stimulatory agents like bacteria and Toll-like receptor (TLR) ligands by measuring cytokine and chemokine secretion using a bead-based assay newly developed for the bovine species. We evaluated the assay performance independently of the manufacturer on samples prepared using a standardized whole blood assay on a large group of cattle. Here, we show that the bead-based multiplex assay combined with a multivariate analysis allows the discrimination of different kinds of stimuli used to induce cytokine secretion and describes a new methodology to exploit these data for an improved interpretation over existing methods.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

The study was conducted on 107 Holstein–Friesian cows from the Pin-au-Haras farm, an experimental dairy cow facility (doi: 10.15454/1.5483257052131956E12) of the French National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE). The average age was 3.4 ± 1.0 years, and 44, 43, and 20 cows were respectively in their first, second and third or higher lactation, for an average parity number of 1.9 ± 0.9 . Of the 107 cows, 28 were pregnant when sampled (23 ± 18 days). Animals were free from zoonotic infections like brucellosis and tuberculosis, and also free from bovine leukosis. Their health status has been carefully examined from two weeks before to two weeks after the blood drawing. Only minor health events (six mastitis, one cystitis, and one lameness case) were recorded in

this time frame, and none yielded a divergent cytokine profile, so all data were kept for analysis. All cows were managed in a single herd and, hence, exposed to the same environmental factors.

Sample Preparation and Stimulation

Blood sampling was performed at 101 ± 11 days post-calving to avoid the period of highest predisposition to infectious diseases due to immune depression in the month after calving, as previously reported (14). Blood was drawn at the jugular vein directly into 1.2 ml stimulation syringes coated with lithium heparin (S-Monovette[®], Sarstedt Marnay, France), and containing 200 μ l of 10 \times stimulating reagent in RPMI-1640 with 0.1% serum albumin and 10 \times penicillin/streptomycin. In this study, two types of stimulating agents were used: three heat-killed bacteria and three Toll-like receptors (TLR) ligands (Table 1). Heat-killed bacteria were *Escherichia coli* (HKEC), *Staphylococcus aureus* (HKSA), and *Streptococcus uberis* (HKSU). The TLR ligands were a synthetic diacylated lipoprotein named Fibroblast-Stimulating Lipopeptide 1 (FSL-1), lipopolysaccharide (LPS), and gardiquimod (GDQ) binding to TLR2/6, 4, and 7/8, respectively in cattle. All reagents were from InvivoGen (InvivoGen, Toulouse, France) except HKSU, which was a home-made preparation kindly provided by FB. Gilbert (ISP, INRAE, Nouzilly, France). Briefly, the HKSU 2211 strain was isolated from a bovine clinical mastitis and was characterized as belonging to the Multilocus Sequence Type (MLST) 6 (clonal complex 5, which is one of the most frequently isolated in Europe (15, 16)). After culture in Dulbecco's modified Eagle medium and optical density determination, bacteria were heat-inactivated at 70°C for 50 min. Inactivation was verified by culture on blood agar Petri dishes.

Stimulation began immediately upon collection and samples were incubated at 38.5°C (the rectal temperature of *Bos taurus* adults) for 24 h. At the end of the incubation period, tubes were spun down at 750 g for 10 min, and plasma samples were aliquoted into 96-well plates for immediate storage at -20°C .

Ethics Statement

All procedures involving animals received approval from the Ethics Committee on Animal Experimentation (agreement No. 2016082518447444), 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. We handled all the animals used in this study in strict accordance with good clinical practices, and we made all efforts to minimize suffering.

Cytokine and Chemokine Measurement

Sample Dilution

Plasma samples were defrosted at 37°C and carefully resuspended. Approximately 100 μ l were transferred to 96-well conical bottom plates and centrifuged for 5 min at 450g to remove any debris that might be present. Then, 30 μ l were transferred into new 96-well conical bottom plates and diluted to 1:10 with assaying buffer.

Bead-Based Multiplex Assay

Cytokine concentrations were determined with a custom 15-plex bovine cytokine assay developed by Merck-Millipore (SPRCUS617, Milliplex[®] xMAP[®], Merck-Millipore, France). The analytes consist of five cytokines involved in the innate response (IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-6, and TNF- α), five of the adaptive response (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , and IL-17A), and five chemokines (CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CXCL8 (IL-8), and CXCL10 (IP-10)).

Assays were carried out on a set of eleven 96-well plates on six separate dates by a single operator by running a batch of two plates. Both plates of a batch contained the low and high concentration controls, but only one contained the seven-point standard. Controls and standards were assayed in duplicates, while the cow samples were assayed as single points.

Each plate was first washed with 200 μ l of wash buffer under agitation for 10 min at room temperature. For the standards and controls, 25 μ l of bead solution (vortexed beforehand) was placed into each well, and 25 μ l of standard or control solution and 25 μ l of matrix serum (total volume of 75 μ l) were added. For samples to be determined, wells were filled with 25 μ l of bead solution, 25 μ l of assay buffer, and 25 μ l of diluted plasma as indicated above. Plates were covered with plastic film and aluminum foil before incubation under agitation (500–700 rpm) overnight at 4°C. At the end of the incubation, the plates were washed 3 times with a wash buffer. The beads were retained by placing the plate on a magnetic support 1 min before the supernatant harvest and during the entire wash procedure. Then, 25 μ l of detection solution was added to each well. The plates were covered with plastic film and incubated under agitation (500–700 rpm) for 1 h at room temperature. To reveal the secondary antibody, 25 μ l of streptavidin-

TABLE 1 | List of the stimuli used in the whole blood assay.

Stimulus	Abbreviation	Concentration	Source	Receptor
Bacteria				
HK <i>Escherichia coli</i> O111:B4	HKEC	10e7/ml	InvivoGen tlr1-hkeb2	complex
HK <i>Staphylococcus aureus</i>	HKSA	10e7/ml	InvivoGen tlr1-hksa	complex
HK <i>Streptococcus uberis</i>	HKSU	10e7/ml	HM	complex
MAMPS				
Fibroblast-Stimulating Lipopeptide 1	FSL-1	1 μ g/ml	InvivoGen tlr1-fsl	TLR2/6
Imidazoquinoline	GDQ	3 μ g/ml	InvivoGen tlr1-gdq-5	TLR7/8
Lipopolysaccharide	LPS	3 μ g/ml	InvivoGen tlr1-3pelps	TLR4

HK, heat-killed; HM, home-made.

phycoerythrin were added and incubated for 30 min at room temperature. Plates were washed 3 times as previously described. Finally, the beads of each well were resuspended in 150 μ l of sheath fluid, and the plates were covered with plastic film and incubated for 5 min at room temperature.

Data Acquisition

To obtain the median fluorescence intensities (MFI), fluorescence intensities were recorded on a MAGPIX[®] system (Luminex[®]) equipped with a CCD camera and processed by the xPONENT[®] software (version 4.2.1324.0, Luminex Corp, Austin TX USA).

Statistical Analysis

Method Validation

The pre-study validation was performed as described by Findlay et al. (17). Following the recommendations of Breen et al. (18), analyses were carried out on raw MFI, i.e., without considering the background values. A four- or five-parameter logistic function was used to fit the dose–response curves to the standard samples:

$$f(x, b, c, d, e, f) = c + \frac{d - c}{(1 + 10^{b(x-e)})^f}$$

with x the concentration, b the opposite of the slope of the function at the inflection point, c the lower asymptote, d the upper asymptote, e the concentration producing a halfway response between c and d , and f the shape parameter (fixed at 1 in the case of a four-parameter logistic function).

The choice between a four- or five-parameter regression curve was based on the Akaike Information Criterion (AIC). Parameter estimation was performed using the Levenberg–Marquardt algorithm (19), weighted by the mean of MFI values. This weighting assumes a response–error relationship, i.e., the function linking the mean to the MFI value standard deviation, following a power-of-the-mean (POM) function (17):

$$\sigma(y) = aE(y)^b$$

with y the analyte concentration, σ the standard deviation of the response, a the proportionality constant, E the mean response, and b the shape parameter.

This assumption was checked for each analyte with linear regression. The goodness of fit of the model was assessed from the standardized residuals values and distributions.

For each cytokine, the recovery rate of the control samples was computed according to the following formula:

$$\tau = \frac{C_{est}}{C_{exp}} \times 100$$

with C_{est} the concentration estimated from the dose–response curves and C_{exp} the expected concentration of the given control sample. The recovery rate was considered correct if it was comprised between 75 and 125% (17).

The precision was estimated by computing coefficients of variation (CV). Assuming that the MFI values associated with a

given standard assay follow a log-normal distribution, the CV was approximated with the following formula (20):

$$CV = \sqrt{e^{(\sigma \times \ln(10))^2} - 1}$$

with σ the standard deviation of log-transformed MFI. The values of σ were computed by combining a bootstrap and a delta method to ensure a better approximation. The CV was computed for each cytokine and the six plates containing standards.

The “S”-shape of the logistic function decreases precision as concentrations reach the asymptotes. Hence, it is necessary to determine the limits of quantification within which measurements are reliable. These limits correspond to concentrations whose coefficient of variation does not exceed 25% (17), and were determined for each cytokine on the six plates containing standards.

Stimuli Discrimination

To investigate the ability of the multiplex cytokine assay to discriminate between different stimuli applied to blood samples, several approaches were investigated, based on estimated concentration values and raw or adjusted to the mean MFI values.

Concentration values were computed with *drLumi* (21, 22). Values outside the quantification range were assigned the upper (lower) limit of quantification when above (below) the range. MFI and concentration values were log10-transformed to handle the heteroscedasticity inherent to immunoassay data.

Adjustment for individual mean cytokine levels was performed after Cohen et al. (13) and adapted to several stimuli conditions. This adjustment makes it possible to obtain the stimulus-related relative cytokine level by considering the average cytokine level secreted by each individual for a given stimulus. More specifically, this adjustment follows two steps:

1 *Standardization of logged values*. This step was carried out on each cytokine separately, including data from all stimuli. The mean of the standardized values was then computed for each individual and each stimulus, which gives, $\forall i \in \llbracket 1, n_i \rrbracket$, $\forall j \in \llbracket 1, n_j \rrbracket$ and $\forall k \in \llbracket 1, n_k \rrbracket$, with n_i the number of individuals, n_j the number of stimuli, and n_k the number of cytokines:

$$m_{i,j} = \frac{1}{n_k} \sum_{k=1}^{n_k} x_{i,j,k}$$

$m_{i,j}$ being the mean of the standardized values for individual i and stimulus j , and $x_{i,j,k}$ the standardized value for individual i , stimulus j , and cytokine k .

2 *Linear regression and residuals retrieving*. Finally, a linear regression was performed for each cytokine using the non-standardized logged values $y_{i,j,k}$ and the mean standardized cytokine values $m_{i,j}$ as the dependent and independent variables, respectively:

$$y_{i,j,k} = m_{i,j} \beta_k + \epsilon_{i,j,k}$$

where β_k is a scalar and $\epsilon_{i,j,k}$ the residual for individual i , stimulus j , and cytokine k .

The final adjusted values were the residuals $\epsilon_{i,j,k}$.

Pairwise comparisons of raw and adjusted concentrations or MFI values were first performed, using the Wilcoxon signed-rank test for paired data, with Holm–Bonferroni correction for multiple comparisons.

Further, multilevel Partial Least Squares Discriminant Analyses (PLS-DA) (23) were carried out, identifying the most discriminating factors for, on one hand, bacterial stimuli and, on the other hand, TLR ligands.

The multilevel approach was applied to consider the non-independent sampling structure of the data by focusing on the within-individual variations induced by stimulations and removing the between-individual variations (23, 24). The number of components chosen was the minimum that allowed a misclassification rate of less than 10%, computed from 10-fold cross validation run 100 times. The involvement of each cytokine in the characterization of the different stimulation conditions in relation to each other was evaluated by analyzing their contribution to the definition of the PLS-DA components and by computing their variable importance in projection (VIP) score (12).

Finally, multilevel sparse PLS-DA (sPLS-DA) (25) analyses were conducted to define the minimal set of cytokines allowing the best discrimination between the different stimulation conditions.

Statistical Software

All statistical analyses were performed on R (version 3.6.3) (26). Assay validation was performed using the *drLumi* package (version 0.1.2) (21, 22), an R package dedicated to multiplex immunoassay data analysis, was used to performed assay validation. The *mixOmics* package (version 6.10.8) was used to perform PLS-DA and sPLS-DA analyses (27).

RESULTS

Characteristics and Validation of the Multiplex Assay for Bovine Cytokines/Chemokines

Plasma supernatants from whole blood stimulations were assayed using the multiplex bovine cytokine/chemokine xMAP[®] assay in a batch of 11 plates. Each run contained a 7-point standard curve and high/low concentration controls that were used to evaluate the performance of the assay. For the external standards, the goodness of fit was correct for all dose–response curves according to the standardized residuals values and their distributions (**Supplementary Figures S1, S2**). Besides, weighing the Levenberg–Marquardt algorithm was justified since the means and variances of MFI are well linked by the POM function (17) (**Supplementary Figure S3**). The characteristics of the logistic functions (number of parameters and parameter estimates) are provided in **Supplementary Table 1**. The curve slopes were gradual except for CXCL8 and CCL3, which showed a steep slope (**Figure 1**). The six fitted dose–response curves of each cytokine barely differed from one plate to another.

The accuracy criterion was met for all cytokines with a few exceptions (**Figure 2**). Indeed, it is generally admitted that a correct recovery rate should be comprised between 75 and 125% for an immunoassay (5). This was the case for all cytokines in the low concentration control except for CXCL8, for which the recovery rate was below 50%. For the high concentration control, the recovery rate was above 125% for some cytokines on two plates (CCL2, CXCL10, IFN- γ and IL-1 α , CXCL10 and IL-1 α), and below 75% on one plate (CXCL8). According to the CV profiles (**Figure 3**), precision was similar and correct across the plates, except for two plates. At the cytokine level, the precision was correct over a wide interval, except for CCL3 and CXCL8. Hence, for a given cytokine, the limits of quantification were quite constant across the plates (**Table 2**). For CCL3 and CXCL8, the ranges of quantification were tighter and their limits more widely distributed.

When the samples prepared with the whole blood assay were assessed, some MFI values were outside the quantification ranges in the set of 107 cows, except for TNF- α and IL-4 at the selected dilution (**Supplementary Table 2**). However, even if an MFI value beyond this range cannot be reliably converted into the concentration unit, it is still meaningful. Indeed, the edges of their distributions are not truncated, except for CXCL8, which means the beads are not saturated and these values reflect the amount of cytokines in a semi-quantitative way (15).

Whole Blood Stimulation With Various Ligands Using An All-In-One Method

To evaluate the cytokine response profile of the group of more than one hundred cows, we adapted the conditions of a previously described blood assay developed for human studies (28). The material design enables sterile blood collection in the field and assays away from laboratory conditions. As mastitis is the major disease of dairy cattle that develops after infection of the mammary gland by three main types of bacteria like *E. coli*, *S. aureus*, and *S. uberis*, we investigated the blood cytokine response after stimulation by each of these three bacteria. Additionally, the responses to two main ligands for TLR2/6 and TLR4, which are known receptors for these bacteria, and also the response to a ligand for TLR7/8, a receptor which binds to single-stranded RNA, were assessed in parallel. The best concentrations for leucocyte activation were adapted from published studies and our own previous experience (**Table 1**). A null condition was also included with very low background measurements (**Supplementary Table 3**). Results obtained using either MFI values or estimated concentrations were in strong agreement, and only those obtained for MFI values are detailed.

Increased Production of Cytokines is Detected in All Stimulation Conditions Over the Null Control

In the null condition, several chemokines like CXCL8 and CCL3 were already at higher concentrations than generally assayed in

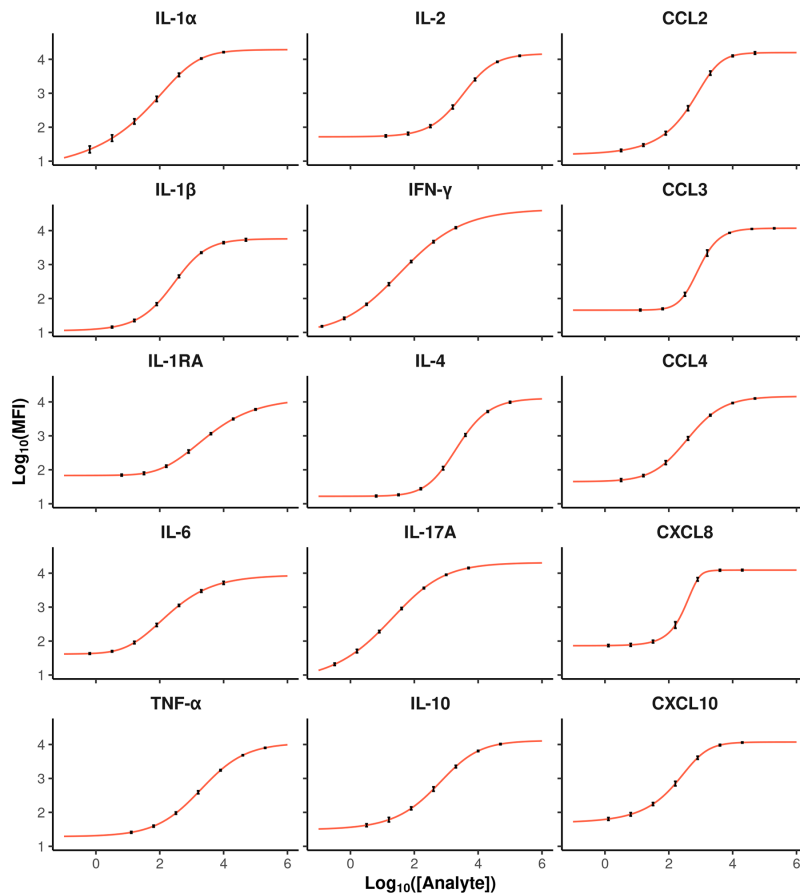


FIGURE 1 | Average dose-response curves for each cytokine (red curves). The x and y-axis represent analyte concentration and the Log10 MFI value, respectively. Each dot corresponds to the average response of a given standard, and the error bars show the variances calculated on values from 6 plates for each cytokine.

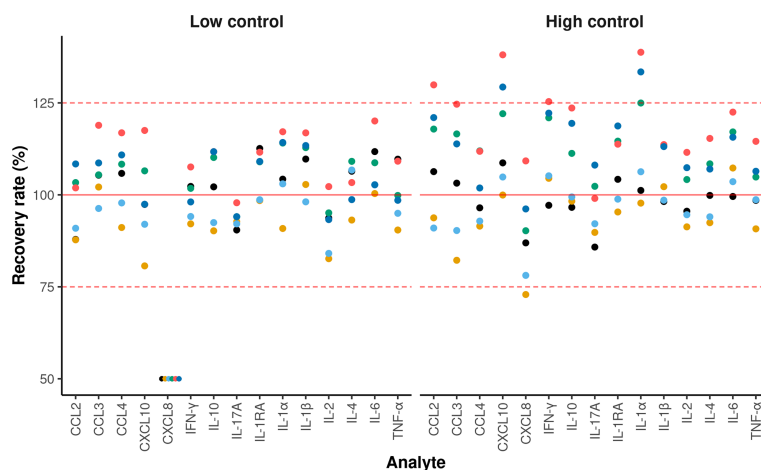


FIGURE 2 | Recovery rates for each cytokine. The x and y-axis represent the analytes and the recovery rate, respectively. Each dot represents the recovery rate of a given plate. The solid red line indicates a 100% recovery rate. A recovery rate is considered correct when the value is between 75 and 125% (dashed red lines). For display purposes, all the samples having a recovery rate of less than 50% were set to 50%. Each color corresponds to one of the six plates containing control samples.

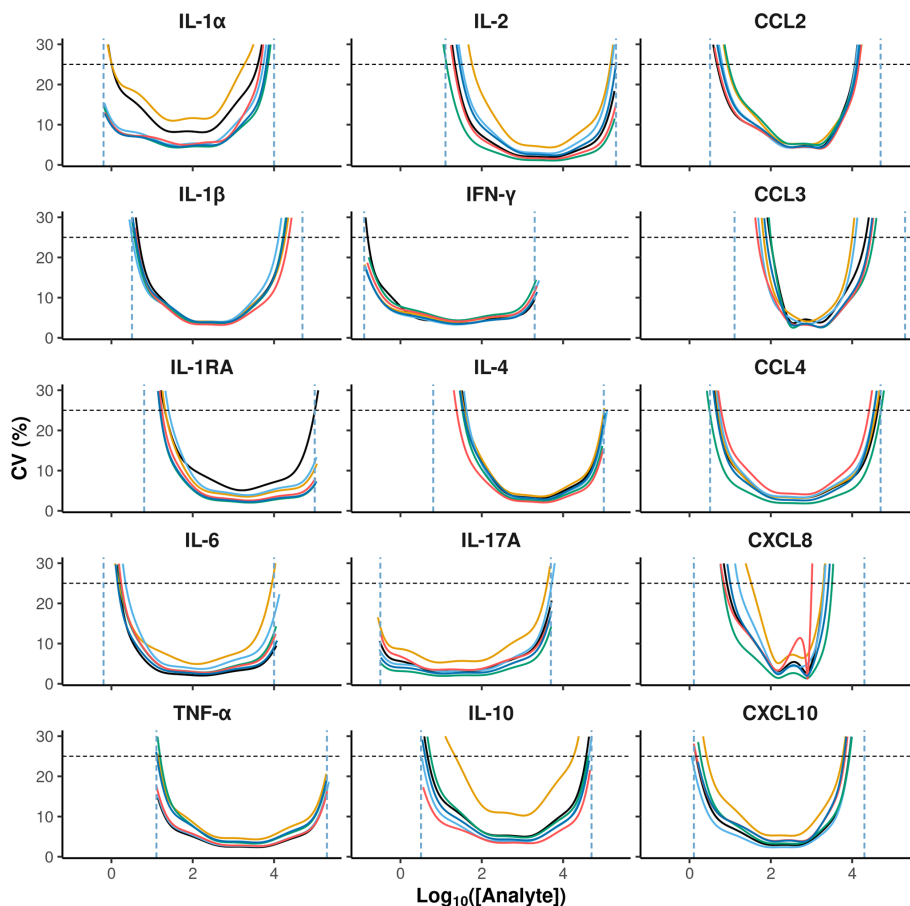


FIGURE 3 | Coefficient of variation of MFI estimates as a function of cytokine concentrations. The x and y-axis represent analyte concentrations in Log10 and the coefficient of variation in percentage, respectively. The values of 6 separate plates are represented in different colors: horizontal black dashed lines indicate the 25% threshold that was used to define the reliable lower and upper quantification limits represented by the vertical blue dashed lines.

TABLE 2 | Limits of quantification (in pg/ml).

Analyte	LLOQ min	LLOQ max	ULOQ min	ULOQ max
CCL2	5	9	11,768	14,639
CCL3	47	100	10,015	33,893
CCL4	3	6	26,168	50,000
CXCL10	1	3	5,842	8,612
CXCL8	7	33	1,012	3,190
IFN-γ	0	0	2,000	2,000
IL-10	3	22	18,022	46,218
IL-17A	0	0	4,068	5,000
IL-1RA	16	25	100,000	100,000
IL-1α	1	1	1,862	7,106
IL-1β	3	5	12,945	22,908
IL-2	14	58	145,399	200,000
IL-4	24	42	92,296	100,000
IL-6	1	2	8,910	10,000
TNF-α	13	16	179,671	200,000

The minimal lower (LLOQ min) and maximal lower (LLOQ max) limit of quantification, and the minimal upper (ULOQ min) and maximal upper (ULOQ max) limit of quantification across the plates are shown.

bovine plasma samples without incubation (data not shown). In all stimulation conditions, stimulated blood samples consistently yielded increased levels of each cytokine compared to their paired unstimulated null controls (**Supplementary Figure 4**). Among the different conditions evaluated in parallel, GDQ and HKSU were associated with the greatest overall increase in cytokine levels, whereas FSL-1, LPS, HKEC, and HKSA induced secretion changes of lower and similar magnitude (**Figure 4A**). Notably, blood stimulation induced biological responses for IFN-γ and TNF-α spanning close to or greater than 500-fold compared to the null condition. Variations in CCL2, IL-2, IL-4, and IL-6 levels occurred in lower (<10 fold) but still significant magnitudes compared with null conditions (**Figure 4A** and **Supplementary Figure 4B**). For the conditions using bacteria, cytokines that are generally associated with inflammatory conditions like IL-1α and β, IL-6, and TNF-α were detected at increased concentrations, as expected. Adaptive cytokines like IFN-γ and IL-17A were also detected, although low expression levels were measured for IL-17A in some conditions. Chemokines were also strongly up, like CXCL8, CCL3, and CCL4.

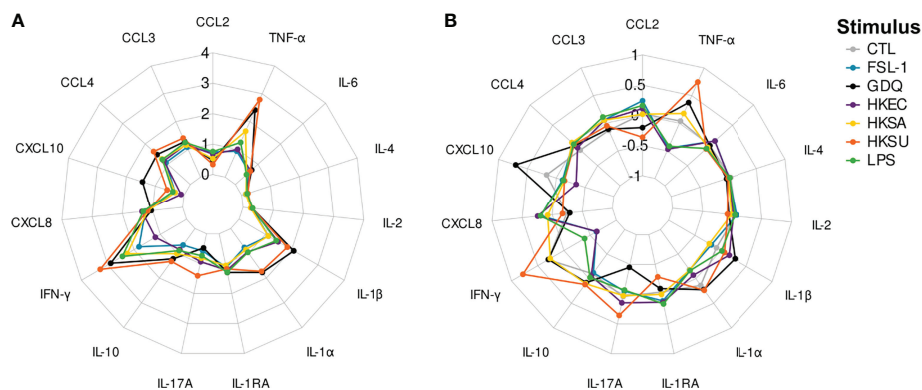


FIGURE 4 | Radarplots of cytokine concentration values obtained for each stimulus. **(A)** represents the log₁₀-transformed fold-changes induced by a stimulus over the null condition. **(B)** represents the adjusted concentration values. CTL, FSL-1, GDQ, HKEC, HKSA, HKSU, and LPS stand for control, fibroblast-stimulating lipopeptide 1, gardiquimod, heat-killed *Escherichia coli*, heat-killed *Staphylococcus aureus*, heat-killed *Streptococcus uberis*, and lipopolysaccharide stimuli, respectively.

Overall, the results show that the standardized blood assay is efficient at producing blood cell activation and cytokine secretion.

Adjusted Cytokine Levels Have Discriminative Capacity to Differentiate Among Bacterial Conditions

The null condition was further excluded from the following analysis to focus on the response to stimuli, and we looked for the best discriminative approach to compare the conditions. Several approaches were compared, based on raw or adjusted cytokine levels. This adjustment was performed following Cohen et al. (13): cytokine levels were regressed against the average cytokine level induced by each stimulus, leading to an individual stimulus-dependent cytokine profile depicting the relative abundance of each cytokine (Figure 4B). These profiles partially differed from those based on raw (unadjusted) values, highlighting the cytokines with the greatest positive or negative relative variation for each stimulation condition. For instance, while IL-1RA did not significantly differ between HKSU and HKSA stimulation conditions ($p=0.427$) when based on raw MFI values, its relative abundance was much higher under the HKSA stimulation condition ($p<10^{-15}$). Sometimes, the direction of pairwise differences was even reversed, as observed for CCL3 or CCL4 under HKSU, HKSA, and HKEC stimulation conditions, with significantly higher raw MFI values but lower relative abundances when blood was stimulated with HKSU.

Multilevel PLS-DA Improves Discrimination Among Bacteria Stimulation and Enables Identification of the Most Contributing Cytokines

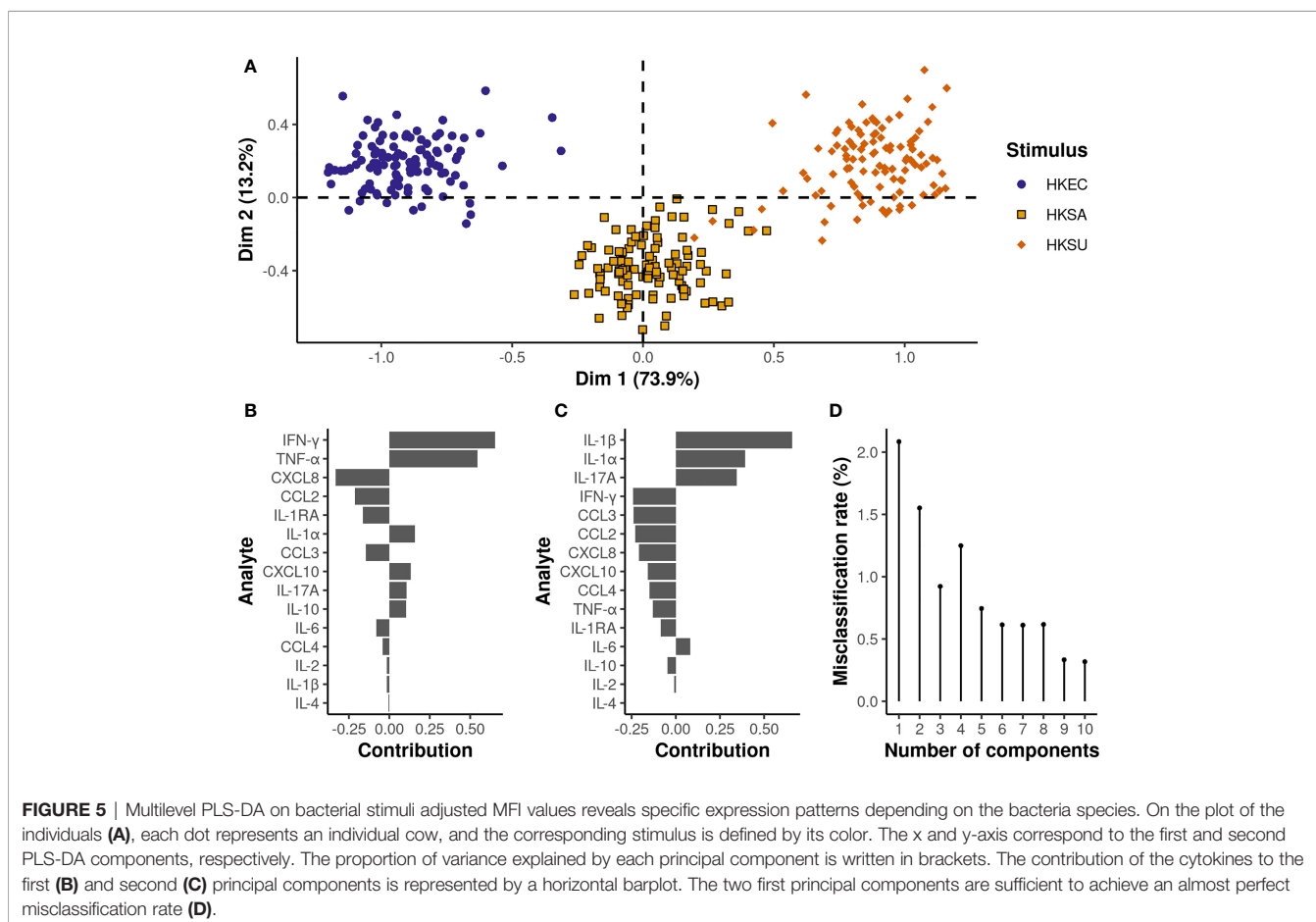
According to the multilevel PLS-DA applied to adjusted MFI values, the multiplex cytokine immunoassay allowed for clear discrimination of the three bacterial stimuli, with a misclassification rate of 1.5% on

the two first components (Figure 5). Cytokines with high variable importance in projection scores ($VIP>1$) were the most significant and contributed most to the first two PLS-DA components (Supplementary Figure 6A). IFN- γ , TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , and CXCL8 were considered the most discriminant cytokines, with higher IFN- γ , TNF- α , IL-1 α , and lower CXCL8 relative levels under HKSU stimulation conditions than under HKSA and HKEC conditions, respectively. Compared to both HKEC and HKSU, HKSA was further characterized by lower IL-1 β and IL-1 α relative levels. IL-17A ($VIP=0.94$ on the first two components) also significantly contributes to the discrimination of the three bacterial stimuli, with relative levels being the highest under HKSU conditions and the lowest under HKSA conditions. Pairwise comparisons (Supplementary Figure 5) revealed other features that also contributed to the discrimination of the three bacterial stimuli, but to a lesser extent ($VIP<0.9$) (Supplementary Figure 6A). For instance, significantly higher relative levels of CXCL10 were found for HKSA and HKSU conditions compared to HKEC, while no difference was found between HKSA and HKSU, explaining the low contribution of this cytokine to the first two PLS-DA components. In the same way, both HKEC and HKSA conditions yielded significantly higher CCL3 relative levels compared to HKSU, while no difference was evidenced between HKEC and HKSA.

Results from the sPLS-DA analysis revealed that quite good discrimination between the three bacterial stimulation conditions could be achieved on the basis of only three cytokines, i.e., IFN- γ , IL-1 β , and TNF- α , with a misclassification rate of 5.6% based on the first two components, and 1.6% using the first three (Supplementary Figure 7).

TLR2 and TLR4 Ligands Share Commonalities Between Them and With Bacteria

The same analysis was also applied to TLR ligand stimulations, leading to a misclassification rate of 10.2% on the two first



components of the PLS-DA analysis and 6.8% on the first three (Figure 6). The first component, explaining almost 75% of the total variance, allowed a clear distinction of the GDQ stimulation condition, whereas the second component mainly contributed to differentiating FLS-1 and LPS conditions. The third component refines the discrimination by compensating for the small overlap between GDQ and FSL-1 on the first component. Almost all cytokine relative levels significantly differed between GDQ and both FSL-1 and LPS conditions (Supplementary Figure 5), with higher TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , and CXCL10, and lower CXCL8 and CCL-3 relative levels contributing most to the characterization of the GDQ condition (VIP>1 on the first 3 components) (Supplementary Figure 6C). FSL-1 and LPS conditions could be differentiated mainly on the basis of higher IL-6 relative levels and, conversely, lower levels of IL-1 β for LPS compared to FSL-1. Again, the sPLS-DA analysis showed that the relative levels of TNF- α and IL-6 were enough to differentiate the three TLR ligands with a misclassification rate of 8.4% on the first 2 components (Supplementary Figure 8).

As expected, the cellular responses to HKEC and LPS conditions were overlapping (Figure 7A). Notably, HKSA and HKSU showed different response profiles from TLR ligands known to activate the same TLR (Figures 7B, C).

Raw MFI Values Have Similar Discriminative Capacity Using PLS-DA

When applied to raw (non-adjusted) MFI values, the PLS-DA analyses led to mostly the same conclusions, with the identification of TNF- α , IFN- γ , and IL-1 β contributing most to the discrimination of the three bacterial stimuli (VIP>1 on the first two components, and a misclassification rate of 0.7% on the first two components) (Supplementary Figures 9 and 6B). Small differences were, however, evidenced regarding the involvement of CXCL8, with a VIP score of 0.63 and 1.1 on the first two components when non-adjusted and adjusted MFI values were analyzed, respectively. Other differences in the stimulus-related signatures were also demonstrated for IL-6, CCL3, CCL4, IL-1RA, and CXCL10 but contributed to a lesser extent in the discrimination of the different bacterial stimuli. Similarly, IFN- γ , CXCL8, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , CXCL10, and IL-6 were identified to contribute most to the discrimination of TLR ligands (VIP>1 on the first three components, misclassification rate of 3.7% on the first three components) when unadjusted MFI values were analyzed (Supplementary Figures 10 and 6D). CCL3 contributed less significantly to TLR ligand discrimination when unadjusted MFI values were analyzed (VIP score 0.8 vs 1.12 on the first 3 components), while the opposite situation was demonstrated for IL-1 α (VIP score 1.26 vs 0.9).

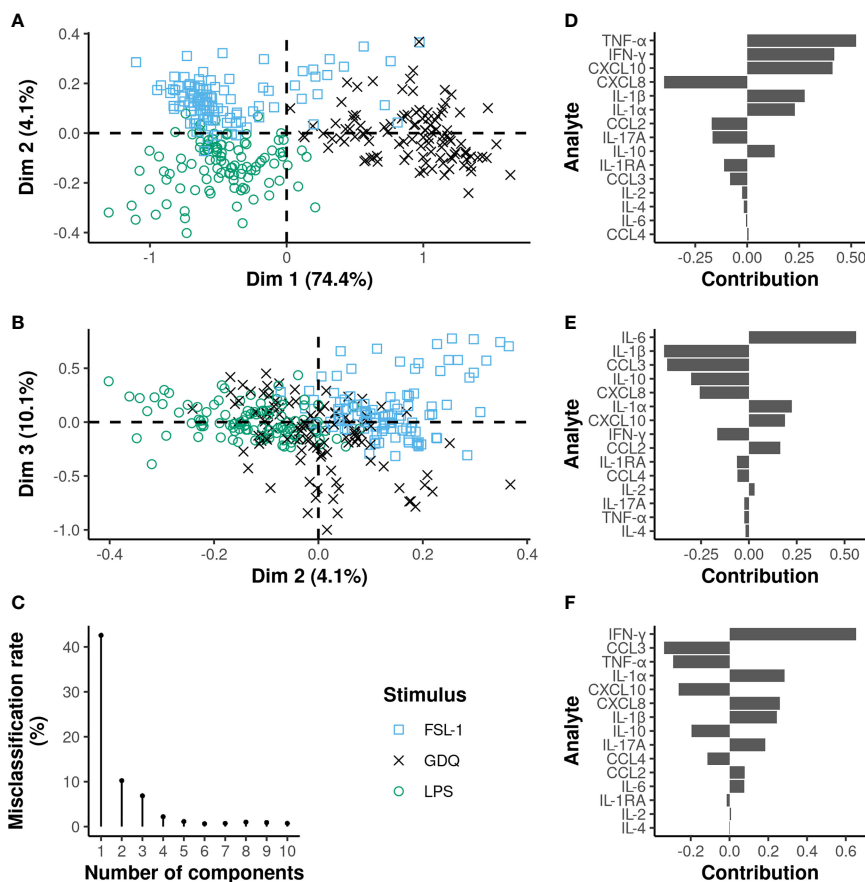
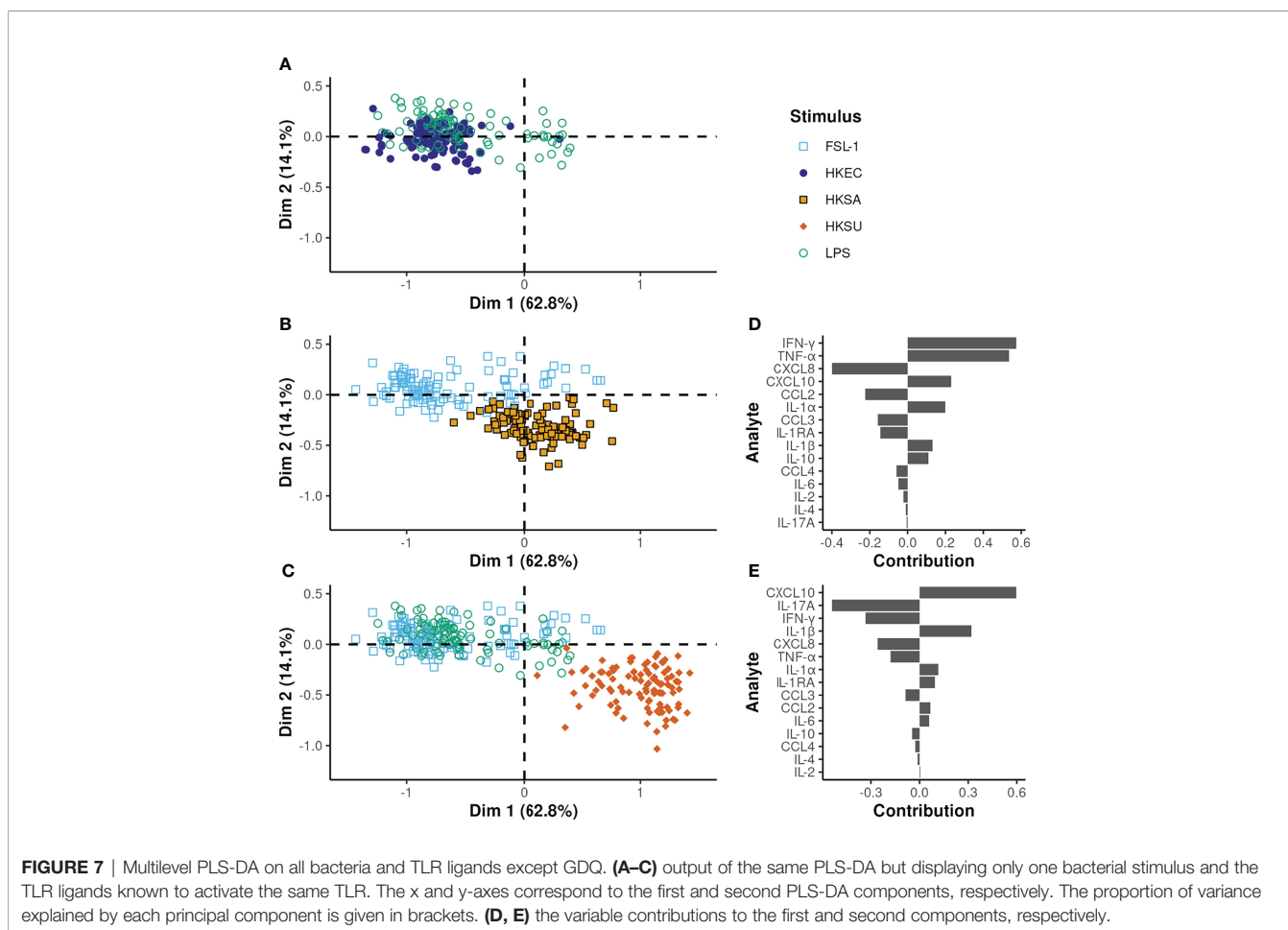


FIGURE 6 | Multilevel PLS-DA on TLR ligands adjusted MFI values identifies commonalities between TLR2/6 and TLR4 engagements. On the plots of the individuals (A, B), each dot represents an individual cow and the corresponding stimulus is defined by the different colors and shapes. The x and y-axis correspond to the PLS-DA components. The proportion of variance explained by each principal component is written in brackets. The contribution of the cytokines to the first (D), second (E) and third (F) principal components are represented by a horizontal barplot. The three first principal components are sufficient to reach a misclassification rate below 10% (C).

DISCUSSION

We evaluated a new multiplex assay based on the Luminex[®] technology developed for cattle and used it to assess the cytokine profile in blood samples stimulated with bacteria of three different genera. These bacteria are highly prevalent in the environment of cattle and are commonly involved in the development of mastitis, a mammary gland inflammation that is the most frequent disease in dairy herds. We also collected profiles using two MAMPs, LPS and FSL-1, which are ligands of TLR4 and TLR2/6, respectively, and GDQ, an endosomal TLR7/8 ligand that engages different signaling pathways. The profiles are in agreement with the previously reported data, with some additional observations (28). Production of innate cytokines like IL-1 β , IL-6, and IL-8 was previously reported in response to three TLR ligands (LPS, Pam3CSK4, and R848 or resiquimod) using a whole blood assay in cattle (9). Several observations can be made from the comparison of our results with those of previous studies. First, the background is noticeably lower for IL-1 β and IL-6 in our study compared with the previously

reported data (9, 10), indicating that further manipulation after blood drawing is associated with cell activation and non-specific cytokine production. Our all-in-one approach enables us to reduce the non-specific secretion of cytokines for a better definition of responsiveness. Second, the inter-individual variation reported there was much higher than what we observed, although a higher production of cytokines in response to LPS was detected (10). This may be due to activation by ligands other than LPS itself, as high TLR2 activity is detected in some commercial sources of LPS (29). To increase specificity, we used ultrapure LPS as a TLR4 ligand. FSL-1, which is shown to be more stable than Pam3CSK4, was used for specific TLR2 activation. The TruCulture[®] method, which is the most advanced development for testing the blood response in humans, has also been used in cattle for the same purpose (10). The concentrations used in previous studies and ours are closely related and different from those used to stimulate human or murine cells, indicating that the stimulation conditions need to be adapted to the bovine species. Ready-to-go commercial reagents for human studies may not be optimal to



evaluate the bovine innate response as it was previously done in calves (10), except if the concentrations are the same as for the presently used bacteria. Furthermore, the array of pathogens that infect *Bos taurus* is essentially different from that of human beings, and this is another reason why reagents developed for human studies may be irrelevant to assessing bovine responsiveness due to a different co-evolution with their host.

In contrast, to most of the studies that describe the expression at the mRNA levels (30–32), we measured secreted cytokine and chemokine proteins. Indeed, most reports describe the expression of cytokine genes in various kinds of cell types upon stimulation with bacteria or their MAMPs. The results of these assays have different meanings and discrepancies between mRNA and protein expression are often reported (33–35); it is worth remembering that only proteins support biological functions, making changes in their quantities more insightful information. Thus, we have established a system protocol that is an improvement over existing methods used to establish cytokine expression profiles. The method can be implemented almost anywhere where an outlet is available to connect the heat block for incubation, and it has a low background and high specificity and accuracy in quantification.

First, the use of an all-in-one method of blood collection and stimulation considerably reduces the cytokine background, as

previously indicated in human studies (28, 36). Limiting the manipulation of the blood samples to set up the stimulation reduces the technical variability and improves reproducibility, improving the reliability of the measure. This is even more marked when the expression profile of PBMCs prepared over a Ficoll cushion is compared with that obtained from the whole blood (37–39). Second, the use of a Luminex® technology-based assay enables the quantification of analytes with a low variance compared to ELISA. From a statistical viewpoint, MFI values provide more insightful information than concentrations do (18), although the latter are more accessible to the biologist for interpretation. Moreover, the automatic calibration step gives a reproducible signal output (40), enabling the comparison of MFI values obtained from different experiments across different MAGPIX® devices. Comparisons of values obtained through other devices require conversion to concentrations. Third, a new method of data exploitation using available modules enables statistical analysis, and the reduction of information to facilitate interpretation of medium and high throughput results in a completely free-of-charge R environment (26).

The bacteria used for blood stimulation are extracellular pathogens commonly involved in the development of bovine mastitis. Infections by extracellular bacteria are usually detected through the release of MAMPs and the ensuing stimulation of

TLR and dectin receptors (41, 42). In contrast, heat-killed bacteria do not have access to the cytosol and may not be able to engage endogenous TLRs. Indeed, part of the immune activation is due to the interaction of some of the TLR agonists like those assayed in our study with their specific receptors. Evaluated in parallel on the same cell source, we showed that heat-killed *E. coli* and LPS, the main ligand for TLR4, induced very similar profiles, indicating that a large part of the response to *E. coli* is actually mediated by TLR4 engagement. In contrast, TLR2 is a receptor for lipoproteins usually found in the cell walls of Gram-positive bacteria like *S. aureus*, which is a prototypic bacteria signaling through this receptor. HKSA and FSL-1 have essentially divergent profiles, indicating that other signals from the killed bacteria are detected by leukocytes and induce a different profile of the cytokine response. The same observation prevails for *S. uberis*, another Gram-positive coccus involved in mastitis development. One possibility is the preferential activation of lymphocyte subsets by the two later bacteria, and lymphocyte-derived cytokines may contribute to feed-forward loops and specific microbial-associated signatures that are different from TLR ligand-only signatures, as previously suggested (43).

Most studies based on the analysis of cytokine profiles either characterize differences in immune response between groups of patients with different severity scores or progression stages (44–47), or try to discriminate between healthy and diseased individuals (44–47). Much attention has also been paid to the characterization of pathogen-specific cytokine profiles in both human and veterinary medicine (12, 48, 49). Differences in pathogen-related cytokine profiles can be revealed by simple pairwise comparisons of absolute cytokine concentration across different diseases or stimulation conditions, but multidimensional data analysis often provides a more in-depth view (12, 28, 50–52). Among various statistical approaches, non-supervised Principal Component Analysis (PCA) has been the most extensively applied, while supervised approaches, namely, PLS-DA, Random Forest, and Support Vector Machine data analysis, have been less widely explored as a means to interpret cytokine profiling (45, 53–56).

As far as we are aware, the characterization of stimulus-specific cellular immune responses based on parallel whole blood stimulation and multiplexed bead-based cytokine profiling on the same individuals has seldom been performed (28). Indeed, the diversity of immune responses in relation to different stimuli is often based on samples from independent individuals. When several stimulation conditions are applied in parallel to blood samples from the same individual or patient, the outcome of interest is most often independent of the stimulation conditions themselves (i.e., different severity scores, progression stages) (44–47). Analysis of multidimensional data derived from multiple stimulus conditions deserves appropriate statistical analysis. First, because cytokine levels are measured in blood samples from the same individual under different stimulation conditions, intra-individual correlation induced by repeated measures must be considered. This was performed by applying a multilevel PLS-DA approach, which separates between-subject

from within-subject variations, before applying the multivariate approaches to the within-subject variation matrix, which is assumed to represent the treatment (i.e., stimulation condition) effect. Although other data integration methods may be applied (57), the multilevel approach has been successfully used in a range of situations with repeated multidimensional biological data (55, 58). In our study, disregarding the intra-individual correlation while leading to the definition of the same stimulus-related cytokine profiles was associated with a lower discriminative power, with a misclassification rate of 7.2% on the first two components for bacterial stimuli and 21.2% on the first three components for TLR ligand stimuli, when based on the analysis of adjusted MFI values (data not shown).

More importantly, since we are interested in defining stimulus-specific signatures, the relative amounts of each cytokine to each other may appear more informative than their absolute amounts. Indeed, in our experiment, HKSU and GDQ stimuli were associated with higher overall cytokine amounts than HKEC or HKSA stimuli. Disregarding the effect of each type of stimulation on the overall level of cytokines leads to distinguishing stimuli on the basis of the absolute number of cytokines they induce, not on the relative importance of cytokines to each other. While the analysis of adjusted or non-adjusted (absolute) responses led to the identification of the same major cytokines in the definition of stimulus-related signatures and similar discriminative power, different interpretations of these profiles emerged. Similar to Duffy et al. (28) in healthy human donors, we found that HKEC and LPS induced a strong pyrogenic cytokine response in cattle with increased TNF- α and IL-1 β concentrations, which were induced by 10 to 1,000-fold compared to the null condition. However, in our experiment, the most potent stimuli, marked by the highest levels of these cytokines, were HKSU and GDQ, and IL-6 concentrations were only moderately increased by 3 to 5 times as compared to the null condition.

The definition of stimuli-related signatures may be based on either concentration or MFI values. Although in our experiment, the two approaches yielded comparable misclassification rates and identified the same major cytokines for both the discrimination of bacterial stimuli and TLR ligands, small differences were evidenced in the implication of CXCL8. Notably, CXCL8 concentrations were the least well estimated due to a larger range of variation than defined by the assay manufacturer, leading to significant proportions of values outside the quantification range, whatever the stimulation condition. A high proportion of values outside the quantification range was also occasionally observed (e.g., for CCL4 and IFN- γ under HKSU stimulation conditions), but this did not interfere with the study results because only this condition was studied. Assigning the upper limit of quantification to values above the range of quantification led to an artificially reduced variance of CXCL8 values, which may explain its lower involvement in stimulus discrimination when concentration values were analyzed. In contrast, keeping MFI values guarantees the preservation of greater variability and better discrimination of the different stimuli based on CXCL8

levels (18). Nevertheless, saturating levels of CXCL8 were observed under the conditions of our experiments, meaning that the true differences between stimuli may not have been properly captured for this cytokine. Accurate assessment of CXCL-8 concentrations would have required using a different sample dilution for this target, which was logistically difficult. Another important piece of information is the identity of the cytokines that are discriminative among bacteria and among TLR ligands. A previous study by Urrutia et al. (43) showed that gene expression is mostly induced by four cytokines (e.g., IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , and IFN- β) that can capture the diversity of the response to various TLR ligands and microbes. Even if the multiplex assay excludes the quantification of IFN- β , it is worth noting that IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ were the most informative cytokines for distinguishing between bacteria. For TLR ligands, IL-1 α and CXCL10, a type I interferon-induced protein, completed the list, reinforcing the view that this small set of cytokines plays a determining role in the initial response to microbes.

Finally, beyond the characterization of the stimulus-related cellular immune response, the development of a standardized whole blood assay and bead-based cytokine profiling also allows us to highlight the great inter-individual variability, within the same or between different stimulation conditions. In this respect, IFN- γ , TNF- α and IL-17A, IL-1 β , and IL-1 α were associated with the highest CV values (**Supplementary Table 4**) across all stimulation conditions that we tested, and may be of interest in defining different immune response profiles within our cow study sample. Investigating this inter-individual variability, however, requires further studies.

Assaying blood to interrogate the responsiveness of dairy cows to mammary pathogens may at first be surprising. However, milk cells respond poorly to stimulation by pathogens or their related MAMPS (59, 60), indicating that they are inappropriate samples for such investigation. For sure, blood composition is different from immune and non-immune (e.g., epithelial) cells located at the mammary epithelial barrier, but it contains a diversity of immune cells, and its composition is less influenced by previous or chronic infections responsible for mastitis. Despite some limitations, blood represents an immune tissue that is accessible and frequently used in other species, including humans, making comparisons to the same stimuli even possible and useful in comparative studies across species. This protocol may also apply to different conditions, like the response to vaccination, and may reveal a sound and effective approach for future bovine immunological studies.

REFERENCES

1. Pulendran B, Li S, Nakaya HI. Systems Vaccinology. *Immunity* (2010) 33 (4):516–29. doi: 10.1016/j.immuni.2010.10.006
2. Davis MM. Systems Immunology. *Curr Opin Immunol* (2020) 65:79–82. doi: 10.1016/j.coi.2020.06.006
3. Lin J-X, Leonard WJ. Fine-Tuning Cytokine Signals. *Annu Rev Immunol* (2019) 37(1):295–324. doi: 10.1146/annurev-immunol-042718-041447

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

All procedures involving animals received approval from the Ethics Committee on Animal Experimentation (agreement No.2016082518447444), with all applicable provisions established by the European directive 2010/63/UE.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GF and PG acquired funding. GF designed the study. SB performed sample collection. RL, FL, and DB provided animal resource and information. SW and NC performed the laboratory analysis. JL and FC designed and performed the statistical analysis. JL, FC, and GF wrote the manuscript. All authors listed have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work and approved it for publication.

FUNDING

The BOVIMMUNE research program was supported by APIS-GENE, who contributed financially to the development of the multiplex assay by MERCK-Millipore under the contract agreement with INRAE.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Sébastien Déjean (Institut de Mathématiques de Toulouse, UMR 5219, Université de Toulouse, CNRS, France) for his advice on the PLS-DA and to Dr. FB Gilbert (ISP, INRAE, Nouzilly, France) for providing HKSU preparation.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.871780/full#supplementary-material>

4. Günther A, Becker M, Göpfert J, Joos T, Schneiderhan-Marra N. Comparison of Bead-Based Fluorescence Versus Planar Electrochemiluminescence Multiplex Immunoassays for Measuring Cytokines in Human Plasma. *Front Immunol* (2020) 11:572634. doi: 10.3389/fimmu.2020.572634
5. Vlasova AN, Saif LJ. Bovine Immunology: Implications for Dairy Cattle. *Front Immunol* (2021) 12:643206. doi: 10.3389/fimmu.2021.643206
6. Clifford V, He Y, Zufferey C, Connell T, Curtis N. Interferon Gamma Release Assays for Monitoring the Response to Treatment for Tuberculosis: A

- Systematic Review. *Tuberculosis* (2015) 95(6):639–50. doi: 10.1016/j.tube.2015.07.002
7. He J, Fan Y, Shen D, Yu M, Shi L, Ding S, et al. Characterization of Cytokine Profile to Distinguish Latent Tuberculosis From Active Tuberculosis and Healthy Controls. *Cytokine* (2020) 135:155218. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155218
 8. Smith K, Kleynhans L, Warren RM, Goosen WJ, Miller MA. Cell-Mediated Immunological Biomarkers and Their Diagnostic Application in Livestock and Wildlife Infected With Mycobacterium Bovis. *Front Immunol* (2021) 12:639605. doi: 10.3389/fimmu.2021.639605
 9. Reid C, Beynon C, Kennedy E, O'Farrelly C, Meade KG. Bovine Innate Immune Phenotyping via a Standardized Whole Blood Stimulation Assay. *Sci Rep* (2021) 11(1). doi: 10.1038/s41598-021-96493-3
 10. O'Brien MB, McLoughlin RM, Meade KG. Application of the TruCulture (R) Whole Blood Stimulation System for Immune Response Profiling in Cattle. *Vet Immunol Immunopathol* (2020) 221. doi: 10.1016/j.vetimm.2020.110025
 11. Wilson JG, Simpson LJ, Ferreira A-M, Rustagi A, Roque J, Asuni A, et al. Cytokine Profile in Plasma of Severe COVID-19 Does Not Differ From ARDS and Sepsis. *JCI Insight* (2020) 5(17):e140289. doi: 10.1172/jci.insight.140289
 12. Mudd PA, Crawford JC, Turner JS, Souquette A, Reynolds D, Bender D, et al. Distinct Inflammatory Profiles Distinguish COVID-19 From Influenza With Limited Contributions From Cytokine Storm. *Sci Adv* (2020) 6(50):eabe3024. doi: 10.1126/sciadv.abe3024
 13. Cohen L, Fiore-Gartland A, Randolph AG, Panoskaltzis-Mortari A, Wong S-S, Ralston J, et al. A Modular Cytokine Analysis Method Reveals Novel Associations With Clinical Phenotypes and Identifies Sets of Co-Signaling Cytokines Across Influenza Natural Infection Cohorts and Healthy Controls. *Front Immunol* (2019) 10:1338. doi: 10.3389/fimmu.2019.01338
 14. Ingvarsen KL, Moyes K. Nutrition, Immune Function and Health of Dairy Cattle. *Animal* (2013) 7:112–22. doi: 10.1017/S175173111200170X
 15. Davies PL, Leigh JA, Bradley AJ, Archer SC, Emes RD, Green MJ. Molecular Epidemiology of Streptococcus Uberis Clinical Mastitis in Dairy Herds: Strain Heterogeneity and Transmission. *J Clin Microbiol* (2016) 54(1):68–74. doi: 10.1128/JCM.01583-15
 16. Käppli N, Morach M, Zurfluh K, Corti S, Nüesch-Inderbinen M, Stephan R. Sequence Types and Antimicrobial Resistance Profiles of Streptococcus Uberis Isolated From Bovine Mastitis. *Front Vet Sci* (2019) 6:234. doi: 10.3389/fvets.2019.00234
 17. Findlay JWA, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, Desilva BS, et al. Validation of Immunoassays for Bioanalysis: A Pharmaceutical Industry Perspective. *J Pharm BioMed Anal* (2000) 21(6):1249–73. doi: 10.1016/S0731-7085(99)00244-7
 18. Breen EJ, Tan W, Khan A. The Statistical Value of Raw Fluorescence Signal in Luminex xMAP Based Multiplex Immunoassays. *Sci Rep* (2016) 6(1):26996. doi: 10.1038/srep26996
 19. Marquardt DW. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. *J Soc Ind Appl Math* (1963) 11(2):431–41. doi: 10.1137/0111030
 20. Canchola JA. Correct Use of Percent Coefficient of Variation (%CV) Formula for Log-Transformed Data. *MOJ Proteomics Bioinform* (2017) 6(3):316–7. doi: 10.15406/mojpb.2017.06.00200
 21. Sanz H, Aponte JJ, Harezlak J, Dong Y, Ayestaran A, Nhabomba A, et al. Drlumi: An Open-Source Package to Manage Data, Calibrate, and Conduct Quality Control of Multiplex Bead-Based Immunoassays Data Analysis. *PLoS One* (2017) 12(11):e0187901. Tetteh KKA, editor. doi: 10.1371/journal.pone.0187901
 22. Sanz H, Aponte J, Harezlak J, Dong Y, Murawska M, Valim C. Drlumi: Multiplex Immunoassays Data Analysis(2015). Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=drLumi>.
 23. Westerhuis JA, van Velzen EJJ, Hoefsloot HCJ, Smilde AK. Multivariate Paired Data Analysis: Multilevel PLSDA Versus OPLSDA. *Metabolomics* (2010) 6(1):119–28. doi: 10.1007/s11306-009-0185-z
 24. Liqueur B, Lê Cao KA, Hocini H, Thi R. A Novel Approach for Biomarker Selection and the Integration of Repeated Measures Experiments From Two Assays. *BMC Bioinf* (2012) 13(1):325–5. doi: 10.1186/1471-2105-13-325
 25. Lê Cao K-A, Boitard S, Besse P. Sparse PLS Discriminant Analysis: Biologically Relevant Feature Selection and Graphical Displays for Multiclass Problems. *BMC Bioinf* (2011) 12(1):253. doi: 10.1186/1471-2105-12-253
 26. R Core Team. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing (2020). Available at: <https://www.R-project.org/>.
 27. Rohart F, Gautier B, Singh A, Le Cao K-A. Mixomics: An R Package for 'Omics Feature Selection and Multiple Data Integration. *PLoS Comput Biol* (2017) 13(11):e1005752. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005752
 28. Duffy D, Rouilly V, Libri V, Hasan M, Beitz B, David M, et al. Functional Analysis via Standardized Whole-Blood Stimulation Systems Defines the Boundaries of a Healthy Immune Response to Complex Stimuli. *Immunity* (2014) 40(3):436–50. doi: 10.1016/j.immuni.2014.03.002
 29. Gilbert FB, Cunha P, Jensen K, Glass EJ, Foucras G, Robert-Granié C, et al. Differential Response of Bovine Mammary Epithelial Cells to Staphylococcus Aureus or Escherichia Coli Agonists of the Innate Immune System. *Vet Res* (2013) 44(1):40. doi: 10.1186/1297-9716-44-40
 30. Taraktoglou M, Szalabska U, Magee DA, Browne JA, Sweeney T, Gormley E, et al. Transcriptional Profiling of Immune Genes in Bovine Monocyte-Derived Macrophages Exposed to Bacterial Antigens. *Vet Immunol Immunopathol* (2011) 140(1–2):130–9. doi: 10.1016/j.vetimm.2010.12.002
 31. Strandberg Y, Gray C, Vuocolo T, Donaldson L, Broadway M, Tellam R. Lipopolysaccharide and Lipoteichoic Acid Induce Different Innate Immune Responses in Bovine Mammary Epithelial Cells. *Cytokine* (2005) 31(1):72–86. doi: 10.1016/j.cyto.2005.02.010
 32. Ito T, Kodama M. Demonstration by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction of Multiple Cytokine mRNA Expression in Bovine Alveolar Macrophages and Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Res Vet Sci* (1996) 60(1):94–6. doi: 10.1016/S0034-5288(96)90140-X
 33. Schindler R, Clark BD, Dinarello CA. Dissociation Between Interleukin-1 Beta mRNA and Protein Synthesis in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J Biol Chem* (1990) 265(18):10232–7. doi: 10.1016/S0021-9258(18)86936-8
 34. Sullivan KE, Cutilli J, Piliero LM, Ghavimi-Alagha D, Starr SE, Campbell DE, et al. Measurement of Cytokine Secretion, Intracellular Protein Expression, and mRNA in Resting and Stimulated Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Clin Diagn Lab Immunol* (2000) 7(6):920–4. doi: 10.1128/CDLI.7.6.920-924.2000
 35. Shebl FM, Pinto LA, García-Piñeres A, Lempicki R, Williams M, Harro C, et al. Comparison of mRNA and Protein Measures of Cytokines Following Vaccination With Human Papillomavirus-16 L1 Virus-Like Particles. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2010) 19(4):978–81. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0064
 36. Wurfel MM, Park WY, Radella F, Ruzinski J, Sandstrom A, Strout J, et al. Identification of High and Low Responders to Lipopolysaccharide in Normal Subjects: An Unbiased Approach to Identify Modulators of Innate Immunity. *J Immunol* (2005) 175(4):2570–8. doi: 10.4049/jimmunol.175.4.2570
 37. De Groot D, Zangerle PF, Gevaert Y, Fassotte MF, Beguin Y, Noizat-Pirenne F, et al. Direct Stimulation of Cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-2, IFN- γ and GM-CSF) in Whole Blood. I. Comparison With Isolated PBMC Stimulation. *Cytokine* (1992) 4(3):239–48. doi: 10.1016/1043-4666(92)90062-v
 38. Chen J, Bruns AH, Donnelly HK, Wunderink RG. Comparative *In Vitro* Stimulation With Lipopolysaccharide to Study Tnfr Gene Expression in Fresh Whole Blood, Fresh and Frozen Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J Immunol Methods* (2010) 357(1–2):33–7. doi: 10.1016/j.jim.2010.03.006
 39. Damsgaard CT, Lauritzen L, Calder PC, Kjær TMR, Frøkiær H. Whole-Blood Culture is a Valid Low-Cost Method to Measure Monocytic Cytokines — A Comparison of Cytokine Production in Cultures of Human Whole-Blood, Mononuclear Cells and Monocytes. *J Immunol Methods* (2009) 340(2):95–101. doi: 10.1016/j.jim.2008.10.005
 40. Luminex corporation. xPONENT® 4.2 for MAGPIX® Software User Manual Austin, Texas (2014). Report No.: 89-00002-00-417 Rev B.
 41. Galán JE. Common Themes in the Design and Function of Bacterial Effectors. *Cell Host Microbe* (2009) 5(6):571–9. doi: 10.1016/j.chom.2009.04.008
 42. Kagan JC, Barton GM. Emerging Principles Governing Signal Transduction by Pattern-Recognition Receptors: Thable 1. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2015) 7(3):a016253. doi: 10.1101/cshperspect.a016253
 43. Urrutia A, Duffy D, Rouilly V, Posseme C, Djebali R, Illanes G, et al. Standardized Whole-Blood Transcriptional Profiling Enables the Deconvolution of Complex Induced Immune Responses. *Cell Rep* (2016) 16(10):2777–91. doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.011

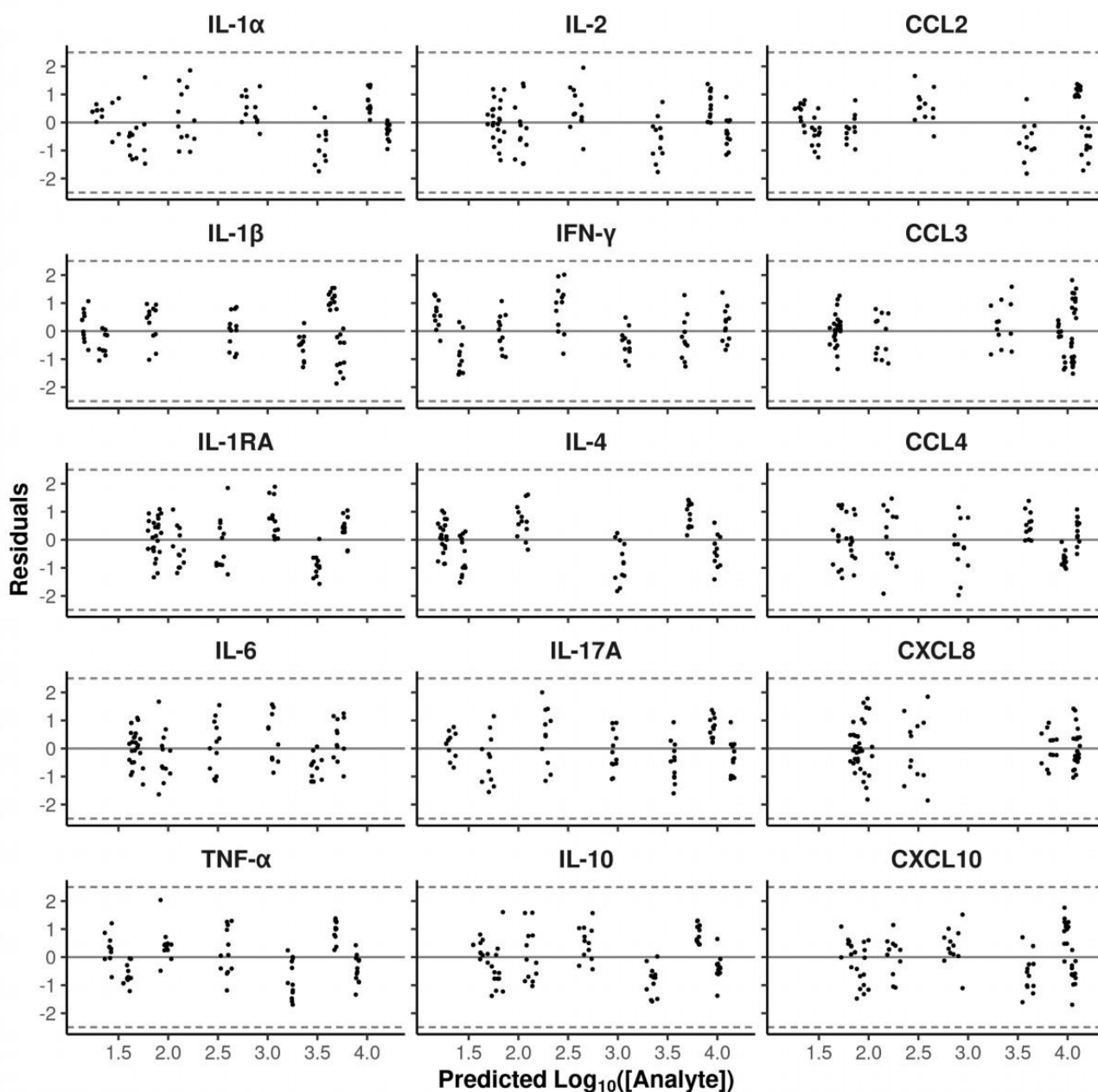
44. Ghazavi A, Ganji A, Keshavarzian N, Rabiemajd S, Mosayebi G. Cytokine Profile and Disease Severity in Patients With COVID-19. *Cytokine* (2021) 137:155323. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155323
45. Robison HM, Chapman CA, Zhou H, Erskine CL, Theel E, Peikert T, et al. Risk Assessment of Latent Tuberculosis Infection Through a Multiplexed Cytokine Biosensor Assay and Machine Learning Feature Selection. *Sci Rep* (2021) 11(1):20544. doi: 10.1038/s41598-021-99754-3
46. Jalkanen J, Maksimov M, Hollmén M, Jalkanen S, Hakovirta H. Compared to Intermittant Claudication Critical Limb Ischemia Is Associated With Elevated Levels of Cytokines. *PLoS One* (2016) 11(9):e0162353. doi: 10.1371/journal.pone.0162353
47. Lee N, Wong CK, Chan PKS, Chan MCW, Wong RYK, Lun SWM, et al. Cytokine Response Patterns in Severe Pandemic 2009 H1N1 and Seasonal Influenza Among Hospitalized Adults. *PLoS One* (2011) 6(10):e26050. doi: 10.1371/journal.pone.0026050
48. Magee DA, Conlon KM, Nalpas NC, Browne JA, Pirson C, Healy C, et al. Innate Cytokine Profiling of Bovine Alveolar Macrophages Reveals Commonalities and Divergence in the Response to Mycobacterium Bovis and Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Tuberc Edinb Scottl* (2014) 94(4):441–50. doi: 10.1016/j.tube.2014.04.004
49. Zandstra J, Jongerius I, Kuijpers TW. Future Biomarkers for Infection and Inflammation in Febrile Children. *Front Immunol* (2021) 12:631308. doi: 10.3389/fimmu.2021.631308
50. Jaumdally SZ, Masson L, Jones HE, Dabee S, Hoover DR, Gamielien H, et al. Lower Genital Tract Cytokine Profiles in South African Women Living With HIV: Influence of Mucosal Sampling. *Sci Rep* (2018) 8:12203. doi: 10.1038/s41598-018-30663-8
51. Ellsworth SG, Rabatic BM, Chen J, Zhao J, Campbell J, Wang W, et al. Principal Component Analysis Identifies Patterns of Cytokine Expression in non-Small Cell Lung Cancer Patients Undergoing Definitive Radiation Therapy. *PLoS One* (2017) 12(9):e0183239. doi: 10.1371/journal.pone.0183239
52. McLean MR, Wragg KM, Lopez E, Kiazzyk SA, Ball TB, Bueti J, et al. Serological and Cellular Inflammatory Signatures in End-Stage Kidney Disease and Latent Tuberculosis. *Clin Transl Immunol* (2021) 10(11):e1355. doi: 10.1002/cti2.1355
53. Adel-Patient K, Grauso M, Abou-Taam R, Guillon B, Dietrich C, Machavoine F, et al. A Comprehensive Analysis of Immune Constituents in Blood and Bronchoalveolar Lavage Allows Identification of an Immune Signature of Severe Asthma in Children. *Front Immunol* (2021) 12:700521. doi: 10.3389/fimmu.2021.700521
54. Vasilev G, Manolova I, Ivanova M, Stanilov I, Miteva L, Stanilova S. The Role of IL-18 in Addition to Th17 Cytokines in Rheumatoid Arthritis Development and Treatment in Women. *Sci Rep* (2021) 11(1):15391. doi: 10.1038/s41598-021-94841-x
55. Stokkeland LMT, Giskeødegård GF, Stridsklev S, Ryan L, Steinkjer B, Tangerås LH, et al. Serum Cytokine Patterns in First Half of Pregnancy. *Cytokine* (2019) 119:188–96. doi: 10.1016/j.cyto.2019.03.013
56. Krysko O, Kondakova E, Vershinina O, Galova E, Blagonravova A, Gorshkova E, et al. Artificial Intelligence Predicts Severity of COVID-19 Based on Correlation of Exaggerated Monocyte Activation, Excessive Organ Damage and Hyperinflammatory Syndrome: A Prospective Clinical Study. *Front Immunol* (2021) 12:715072. doi: 10.3389/fimmu.2021.715072
57. Wanichthanarak K, Jeamsripong S, Pornputtapong N, Khoomrung S. Accounting for Biological Variation With Linear Mixed-Effects Modelling Improves the Quality of Clinical Metabolomics Data. *Comput Struct Biotechnol J* (2019) 17:611–8. doi: 10.1016/j.csbj.2019.04.009
58. The EPIC Consortium, Lee AH, Shannon CP, Amenyogbe N, Bennike TB, Diray-Arce J, et al. Dynamic Molecular Changes During the First Week of Human Life Follow a Robust Developmental Trajectory. *Nat Commun* (2019) 10(1):1092. doi: 10.1038/s41467-019-08794-x
59. Rivas AL, Tadevosyan R, Quimby FW, Lein DH. Blood and Milk Cellular Immune Responses of Mastitic non-Periparturient Cows Inoculated With Staphylococcus Aureus. *7. Can J Vet Res* (2002) 66(2):125–31.
60. Mehrzad J, Duchateau L, Pyörälä S, Burvenich C. Blood and Milk Neutrophil Chemiluminescence and Viability in Primiparous and Pluriparous Dairy Cows During Late Pregnancy, Around Parturition and Early Lactation. *J Dairy Sci* (2002) 85(12):3268–76. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74415-9

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

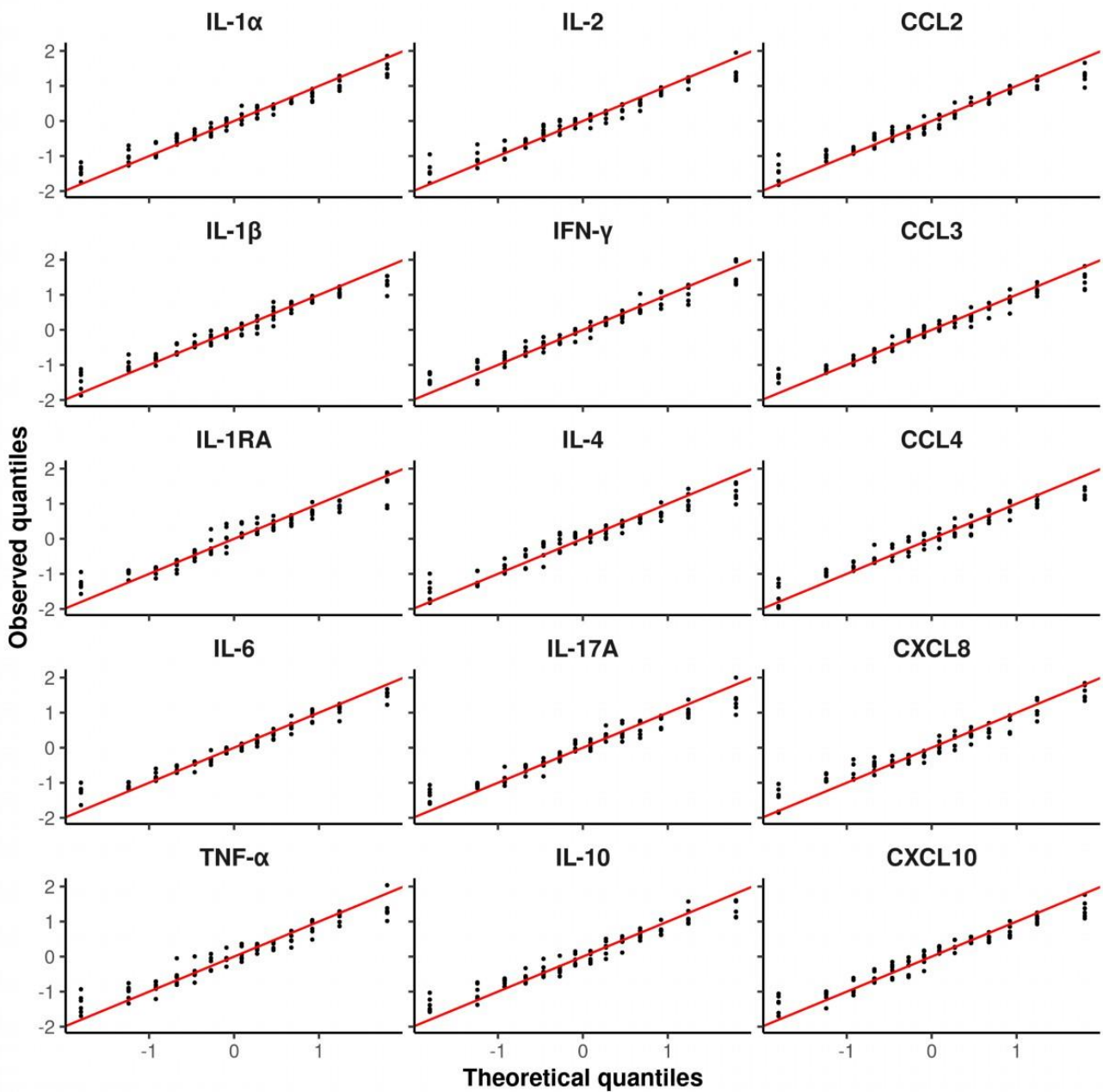
Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Lesueur, Walachowski, Barbey, Cebon, Lefebvre, Launay, Boichard, Germon, Corbiere and Foucras. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

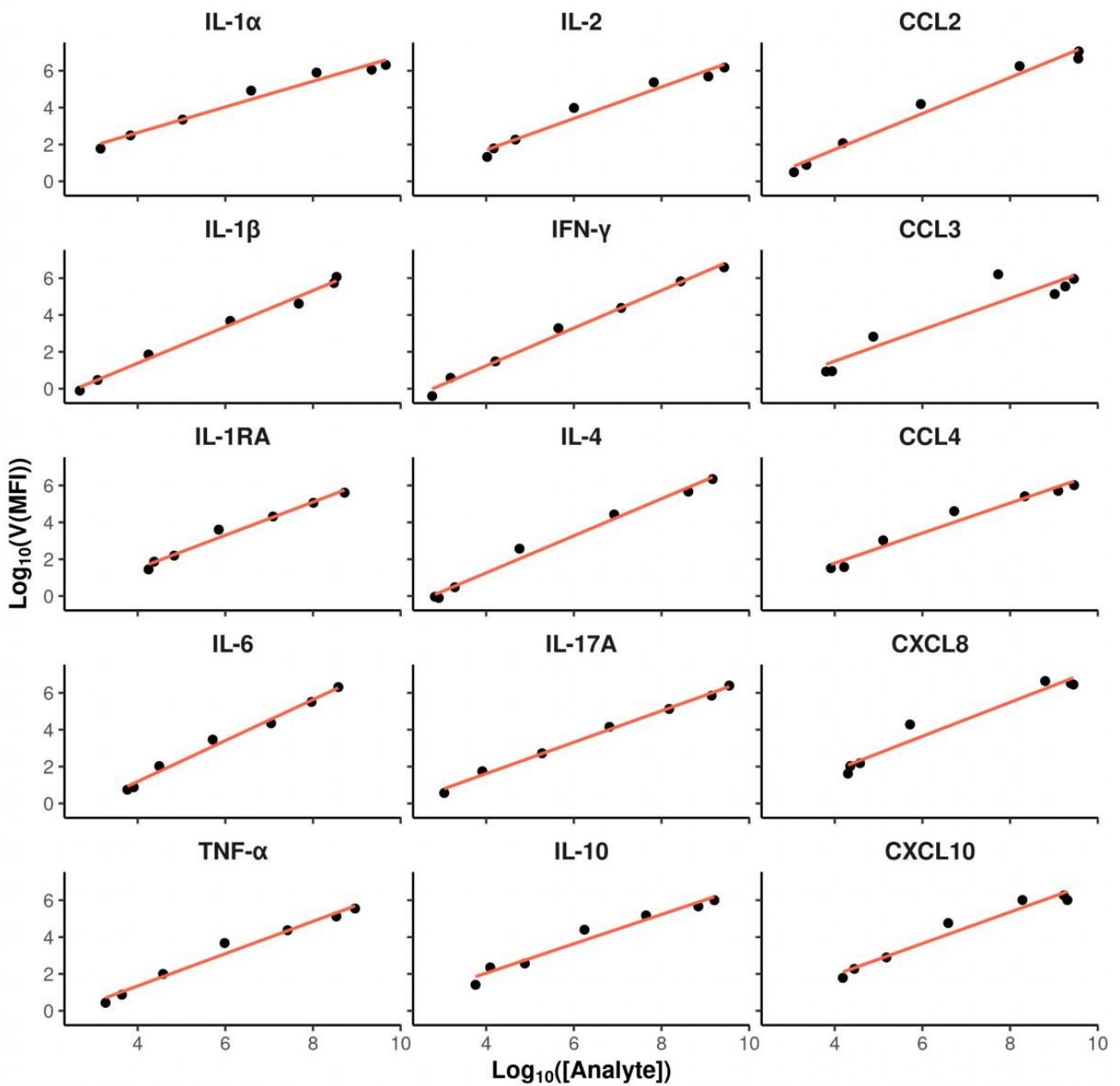
Supplementary Material



Supplementary Figure 1. Distribution of standardized residuals for each cytokine. The x and y-axis correspond to the predicted cytokine concentrations in Log₁₀ scale and the residuals (difference between the predicted and the observed cytokine concentrations), respectively. Each point represents a standard sample. The solid line corresponds to a perfect match between observed and expected concentrations and the dashed lines correspond to the upper and lower limits of acceptance.



Supplementary Figure 2. Quantile-quantile diagrams of standardized residuals for each analyte. The x and y-axis represent the quantiles of a standard normal distribution and those of standardized residuals distributions, respectively. If standardized residuals follow a normal distribution, the dots are supposed to be distributed close to the red line.



Supplementary Figure 3. Power-of-the-mean (POM) relationship between the variance and the mean MFI values. The x and y-axis represent the MFI values and their variances, on the Log10 scale, respectively. Each point corresponds to a standard and the red lines represent the linear regression between the MFI variance and the average MFI values of the standards, on the Log10 scale.

Supplementary Material

Supplementary Table 1. Coefficients of the logistic functions used for fitting the dose-response curves. A 5-parameter logistic function was implemented except when is indicated ‘NA’ showing that a 4-parameter logistic function was used.

Analyte	Plate	b	c	d	e	f	Analyte	Plate	b	c	d	e	f
IL-1 α	1	-0.69	1.24	4.31	2.22	0.63	IL-4	7	-0.85	1.18	4.08	3.26	1.16
IL-1 α	3	-0.86	0.67	4.27	2.6	0.31	IL-4	9	-0.86	1.22	4.11	3.27	1.16
IL-1 α	5	-0.86	0.66	4.29	2.67	0.31	IL-4	11	-0.76	1.2	4.16	3.07	1.41
IL-1 α	7	-1.27	-0.02	4.23	3.04	0.13	CCL4	1	-0.66	1.65	4.18	2.28	1.44
IL-1 α	9	-0.96	0.42	4.29	2.84	0.22	CCL4	3	-0.71	1.69	4.16	2.32	1.37
IL-1 α	11	-0.73	0.89	4.33	2.48	0.41	CCL4	5	-0.81	1.64	4.15	2.62	0.97
IL-2	1	-0.88	1.72	4.15	3.54	0.9	CCL4	7	-0.79	1.58	4.15	2.64	0.96
IL-2	3	-0.91	1.71	4.14	3.55	0.87	CCL4	9	-0.83	1.65	4.14	2.61	0.98
IL-2	5	-0.96	1.72	4.15	3.68	0.77	CCL4	11	-0.66	1.7	4.2	2.11	1.68
IL-2	7	-0.9	1.67	4.16	3.63	0.87	IL-6	1	-0.45	1.62	3.96	-0.45	12.24
IL-2	9	-0.94	1.71	4.17	3.69	0.79	IL-6	3	-0.48	1.63	3.88	0.23	6.61
IL-2	11	-0.79	1.77	4.21	3.4	1.15	IL-6	5	-0.51	1.63	3.91	0.89	3.75
CCL2	1	-1.55	1.14	4.15	3.32	0.28	IL-6	7	-0.49	1.6	3.95	0.78	4.24
CCL2	3	-1.33	1.25	4.17	3.12	0.42	IL-6	9	-0.45	1.65	4.06	0.44	5.37
CCL2	5	-1.31	1.23	4.21	3.22	0.43	IL-6	11	-0.64	1.56	3.91	2.16	NA
CCL2	7	-1.52	1.09	4.2	3.39	0.29	IL-17A	1	-0.54	1.02	4.29	1.35	0.93
CCL2	9	-1.48	1.17	4.22	3.31	0.33	IL-17A	3	-0.67	0.52	4.24	2.04	0.39
CCL2	11	-1.09	1.26	4.25	3.04	0.55	IL-17A	5	-0.63	0.59	4.28	1.93	0.47
IL-1 β	1	-0.84	1.13	3.73	2.43	0.96	IL-17A	7	-0.44	1.06	4.41	0.44	2.14
IL-1 β	3	-0.99	0.99	3.71	2.74	0.55	IL-17A	9	-0.62	0.54	4.3	1.96	0.45
IL-1 β	5	-0.94	1.03	3.75	2.69	0.67	IL-17A	11	-0.53	0.75	4.35	1.63	0.67
IL-1 β	7	-0.82	1.06	3.77	2.46	0.98	CXCL8	1	-3.14	1.86	4.06	2.8	0.29
IL-1 β	9	-0.92	1.03	3.79	2.71	0.67	CXCL8	3	-2.4	1.88	4.08	2.6	0.51
IL-1 β	11	-0.82	1.04	3.81	2.52	0.84	CXCL8	5	-2.67	1.84	4.1	2.76	0.4
IFN- γ	1	-0.33	1.16	4.82	-1.42	8.04	CXCL8	7	-7.26	1.8	4.08	2.98	0.11
IFN- γ	3	-0.49	0.97	4.45	1.49	NA	CXCL8	9	-2.77	1.89	4.1	2.79	0.38
IFN- γ	5	-0.47	0.94	4.57	1.57	NA	CXCL8	11	-2.11	1.91	4.12	2.64	0.52
IFN- γ	7	-0.44	0.88	4.65	1.61	NA	TNF- α	1	-0.68	1.27	4	3.46	0.8
IFN- γ	9	-0.45	0.9	4.65	1.59	NA	TNF- α	3	-0.66	1.28	4.01	3.43	0.82
IFN- γ	11	-0.43	0.86	4.68	1.53	NA	TNF- α	5	-0.59	1.36	4.06	3.03	1.36
CCL3	1	-1.07	1.66	4.07	2.39	2.92	TNF- α	7	-0.67	1.21	4.03	3.55	0.77
CCL3	3	-1.41	1.64	4.05	2.88	NA	TNF- α	9	-0.6	1.3	4.08	3.24	1.06
CCL3	5	-1.04	1.68	4.08	2.13	5.37	TNF- α	11	-0.54	1.3	4.11	3.05	1.23
CCL3	7	-1.17	1.6	4.08	2.85	1.29	IL-10	1	-0.74	1.51	4.1	3.03	0.69
CCL3	9	-1.17	1.69	4.09	2.63	2.09	IL-10	3	-0.76	1.48	4.08	2.98	0.68
CCL3	11	-1.46	1.65	4.05	2.89	NA	IL-10	5	-0.71	1.52	4.13	2.93	0.83
IL-1RA	1	-0.65	1.75	3.92	3.3	NA	IL-10	7	-0.85	1.32	4.09	3.37	0.45
IL-1RA	3	-0.4	1.85	4.14	0.48	11.72	IL-10	9	-0.76	1.49	4.13	3.11	0.65
IL-1RA	5	-0.44	1.85	4.11	1.47	5.78	IL-10	11	-0.64	1.59	4.17	2.8	0.94
IL-1RA	7	-0.42	1.79	4.13	1.18	6.95	CXCL10	1	-1.18	1.73	4.06	2.72	0.45
IL-1RA	9	-0.41	1.86	4.19	1.17	7	CXCL10	3	-1.2	1.73	4.06	2.67	0.45
IL-1RA	11	-0.38	1.87	4.21	-0.53	23.86	CXCL10	5	-1.11	1.72	4.08	2.68	0.51
IL-4	1	-0.78	1.24	4.09	3.03	1.51	CXCL10	7	-1.36	1.56	4.05	2.93	0.31
IL-4	3	-0.75	1.25	4.09	2.8	2.02	CXCL10	9	-1.43	1.66	4.08	2.94	0.3
IL-4	5	-0.79	1.22	4.12	3.05	1.52	CXCL10	11	-1.03	1.77	4.1	2.59	0.55

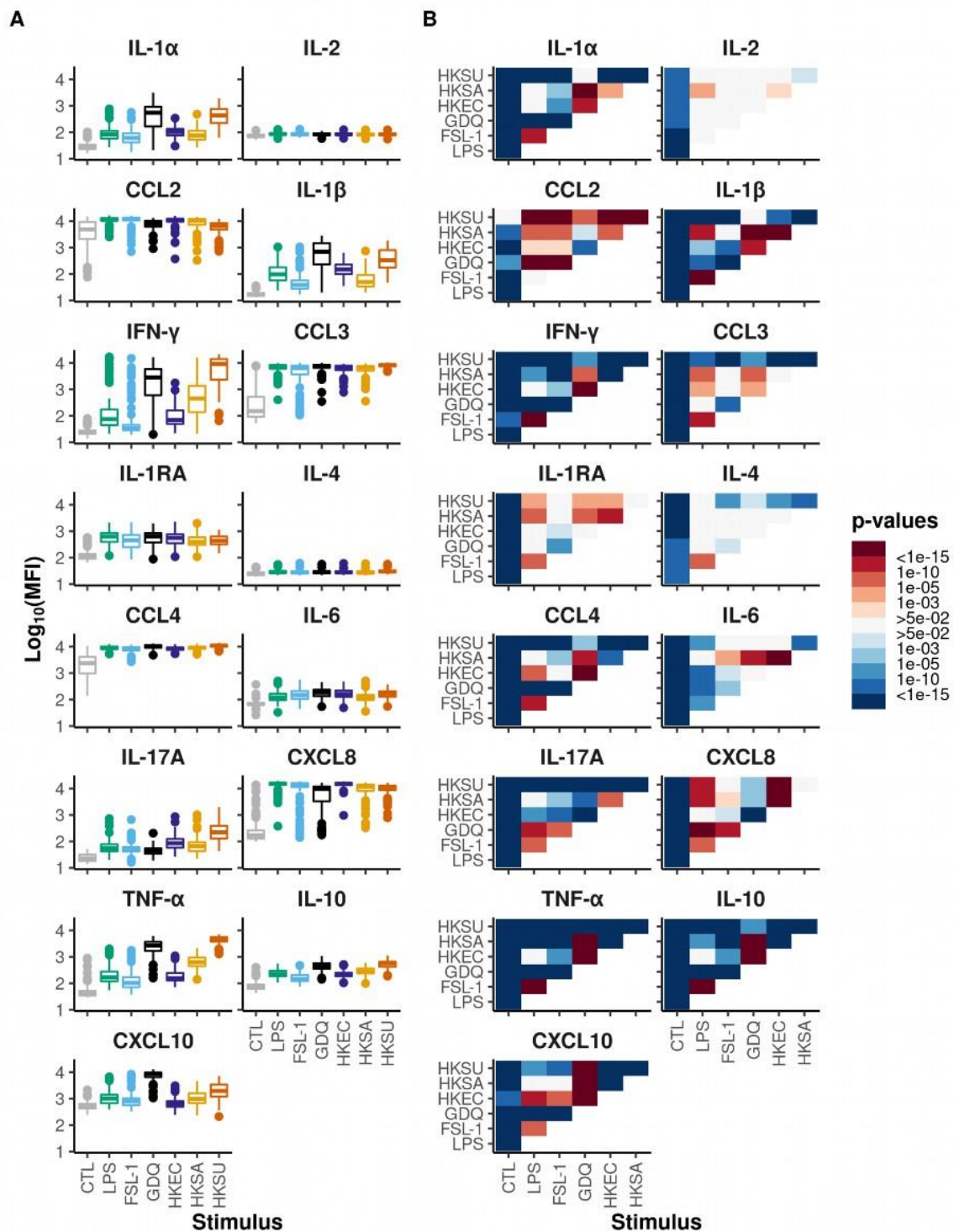
Supplementary Table 2. Proportions of individuals outside the range of quantification. They are given in percentage for each stimulus and cytokine. The columns “lower” and “upper” give respectively the proportions of individuals below and above the ranges of quantification.

Analyte	CTL (%)		HKEC (%)		HKSA (%)		HKSU (%)		FSL-1 (%)		GDQ (%)		LPS (%)	
	lower	upper	lower	upper	lower	upper	lower	upper	lower	upper	lower	upper	lower	upper
CCL2	0	4.7	0	12.1	0	8.4	0	0	0	34.6	0	2.8	0	22.4
CCL3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.9	0	0
CCL4	0	0	0	0.9	0	2.8	0	23.4	0	1.9	0	14	0	2.8
CXCL8	0	3.7	0	92.5	0	54.2	0	45.8	0	76.6	0	33.6	0	86
CXCL10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11.2	0	0
IFN-γ	0.9	0	0	0	0	0.9	0	32.7	0	0.9	0	4.7	0	5.6
IL-10	1.9	0	0	0	0	0	0	0	0.9	0	0	0	0	0
IL-17A	43.9	0	0	0	0.9	0	0	0	3.7	0	3.7	0	1.9	0
IL-1RA	7.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-1α	28	0	0	0	0.9	0	0	0	2.8	0	0.9	0	1.9	0
IL-1β	21.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-2	8.4	0	0	0	1.9	0	1.9	0	0.9	0	1.9	0	1.9	0
IL-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-6	2.8	0	0	0	0.9	0	0	0	0.9	0	0	0	0.9	0
TNF-α	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

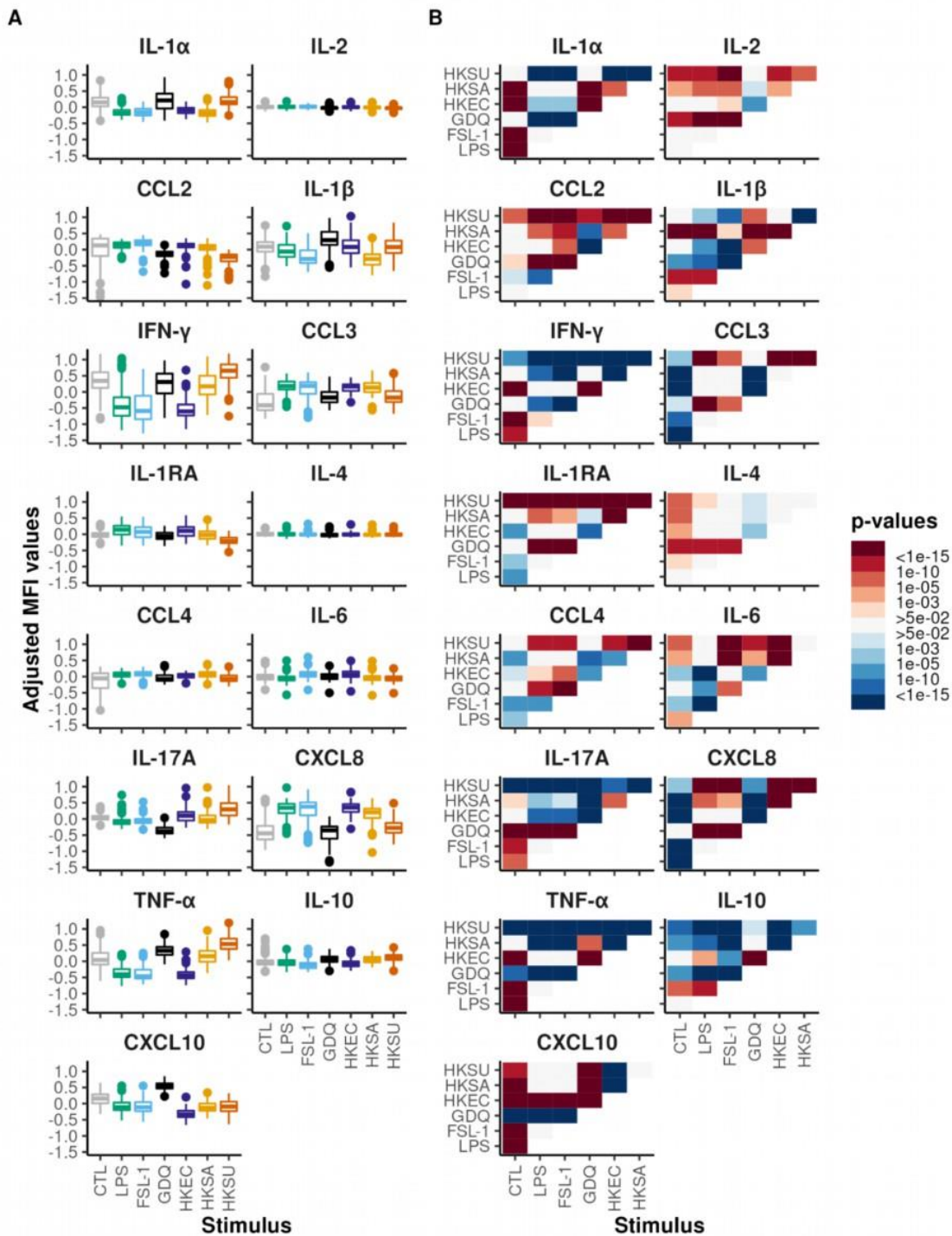
Supplementary Material

Supplementary Table 3. Analyte concentrations in the null condition. Quartile values are shown for each analyte (in pg/mL).

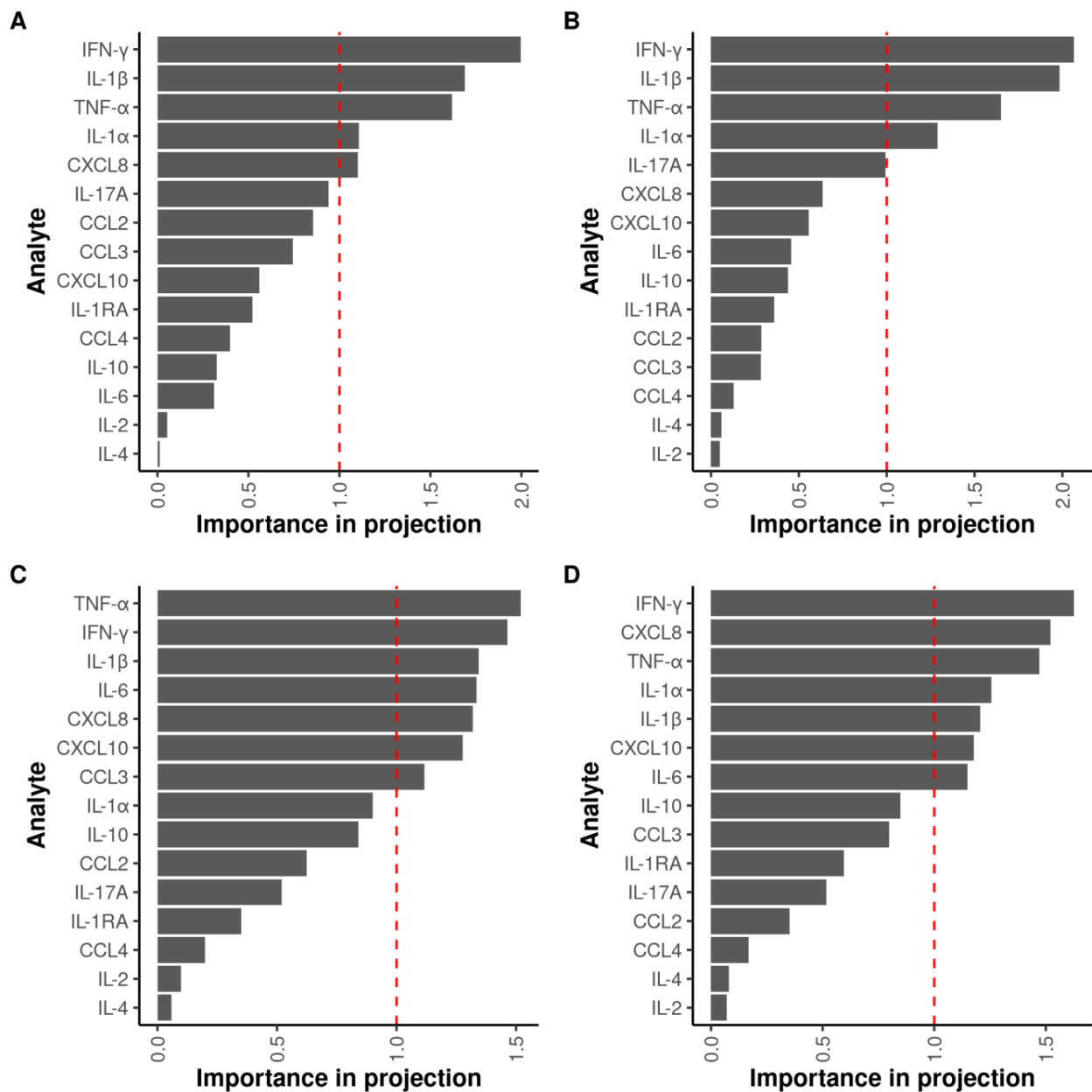
Analyte	1st quartile	Median	3rd quartile
CCL2	1,311	2,479	5,332
CCL3	226	373	722
CCL4	446	1,133	2,048
CXCL8	69	98	153
CXCL10	98	119	154
IFN-γ	0	0	1
IL-10	18	28	44
IL-17A	0	0	1
IL-1RA	65	128	200
IL-1α	1	1	2
IL-1β	5	7	10
IL-2	73	113	165
IL-4	97	121	165
IL-6	8	9	12
TNF-α	42	70	123



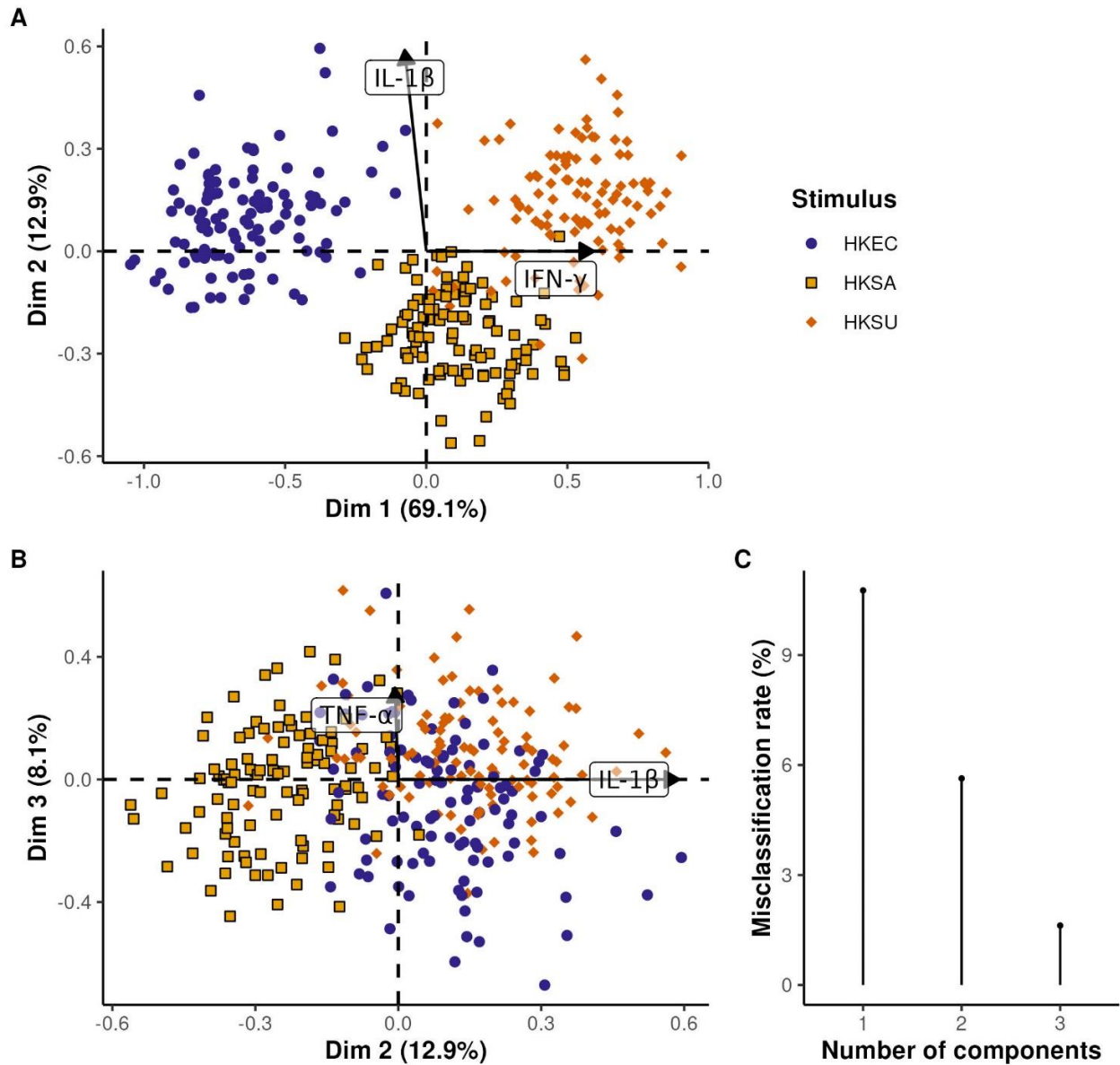
Supplementary Figure 4. (A) Distributions of raw Log₁₀-MFI values for each cytokine under different stimulus conditions, obtained from 107 cows. (B) Inter-stimuli pairwise comparisons for each cytokine, using the Wilcoxon signed-rank test with Holm-Bonferroni correction for multiple comparisons. A gradient of blue (conversely red) color indicates that the Log₁₀-MFI values under the condition on the horizontal x-axis are lower (conversely greater) than the ones under the condition on the vertical y-axis.



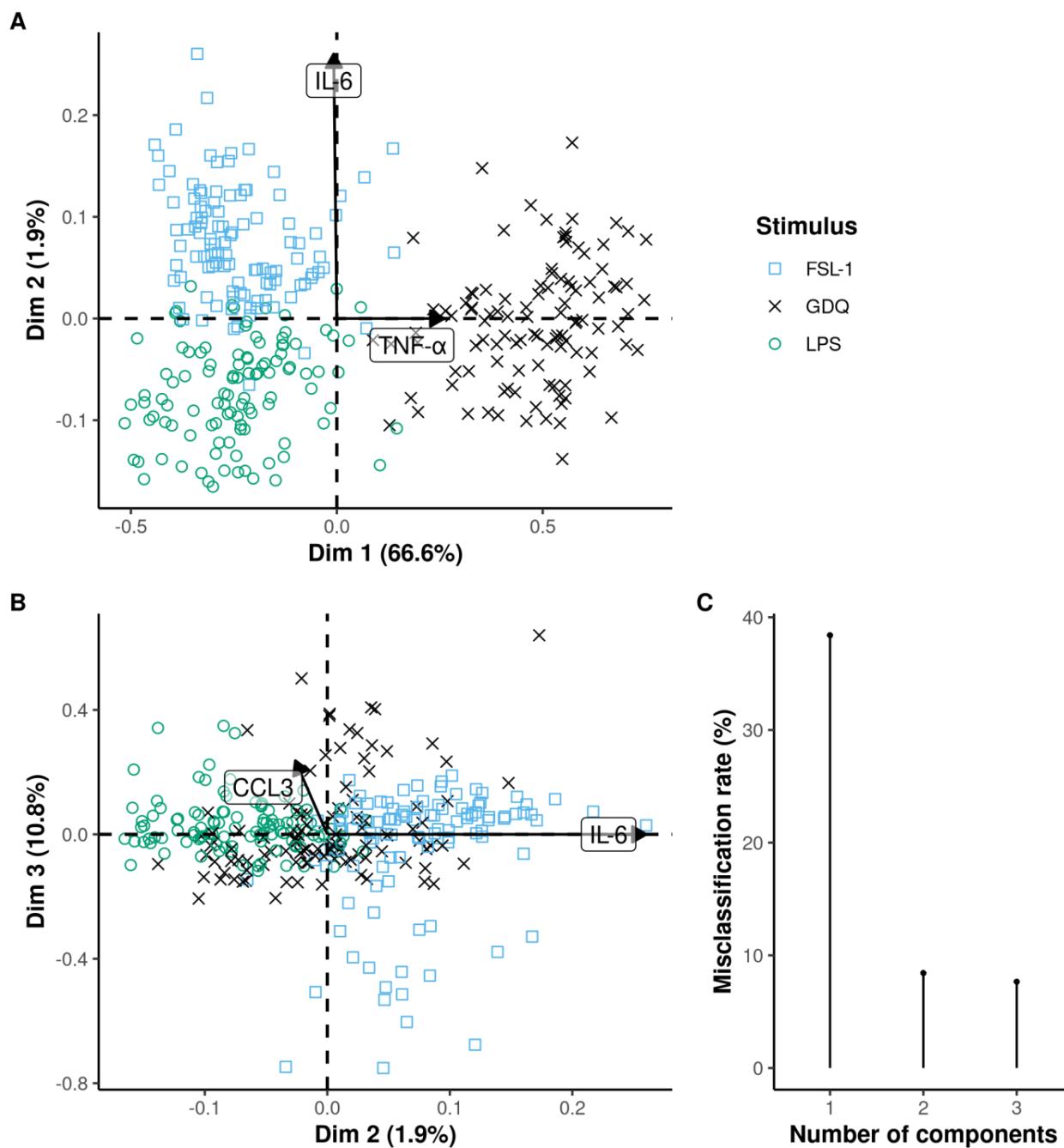
Supplementary Figure 5. (A) Distributions of adjusted to the mean MFI values for each cytokine under different stimulus conditions, obtained from 107 cows. (B) Inter-stimuli pairwise comparisons for each cytokine, using the Wilcoxon signed-rank test with Holm-Bonferroni correction for multiple comparisons. A gradient of blue (conversely red) color indicates that the adjusted MFI values under the condition on the horizontal x-axis are lower (conversely greater) than the ones under the condition on the vertical y-axis.



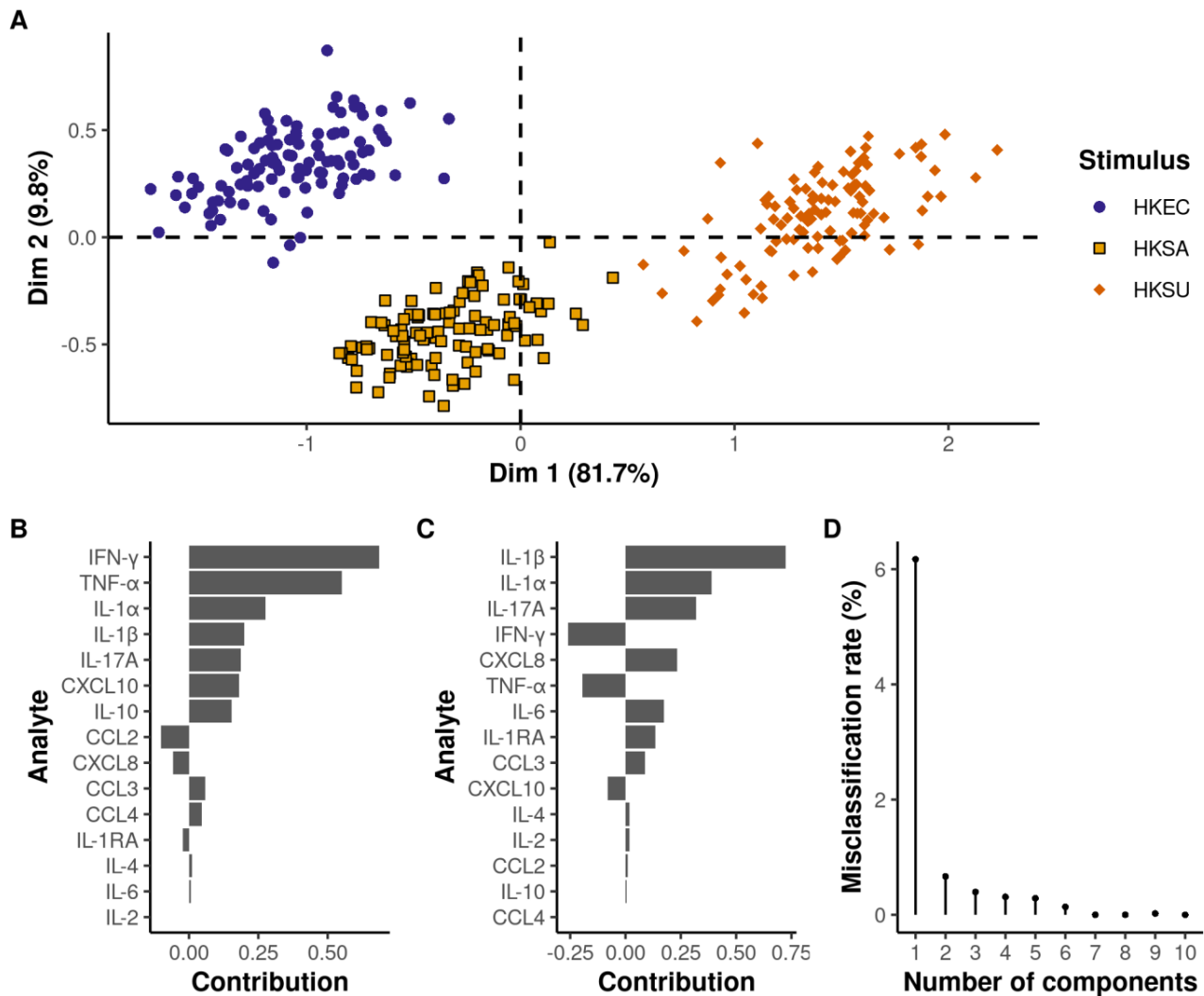
Supplementary Figure 6. Horizontal barplot of the variable importance in projection (VIP) scores obtained for the multilevel PLS-DA realised on bacterial adjusted (**A**) and unadjusted MFI values (**B**), and TLR ligands adjusted (**C**) and unadjusted MFI values (**D**). VIP scores reflect the relative importance of each variable to discriminate the various stimulation conditions. A variable with a VIP score above 1 (vertical red dash line) plays a major role in the prediction model.



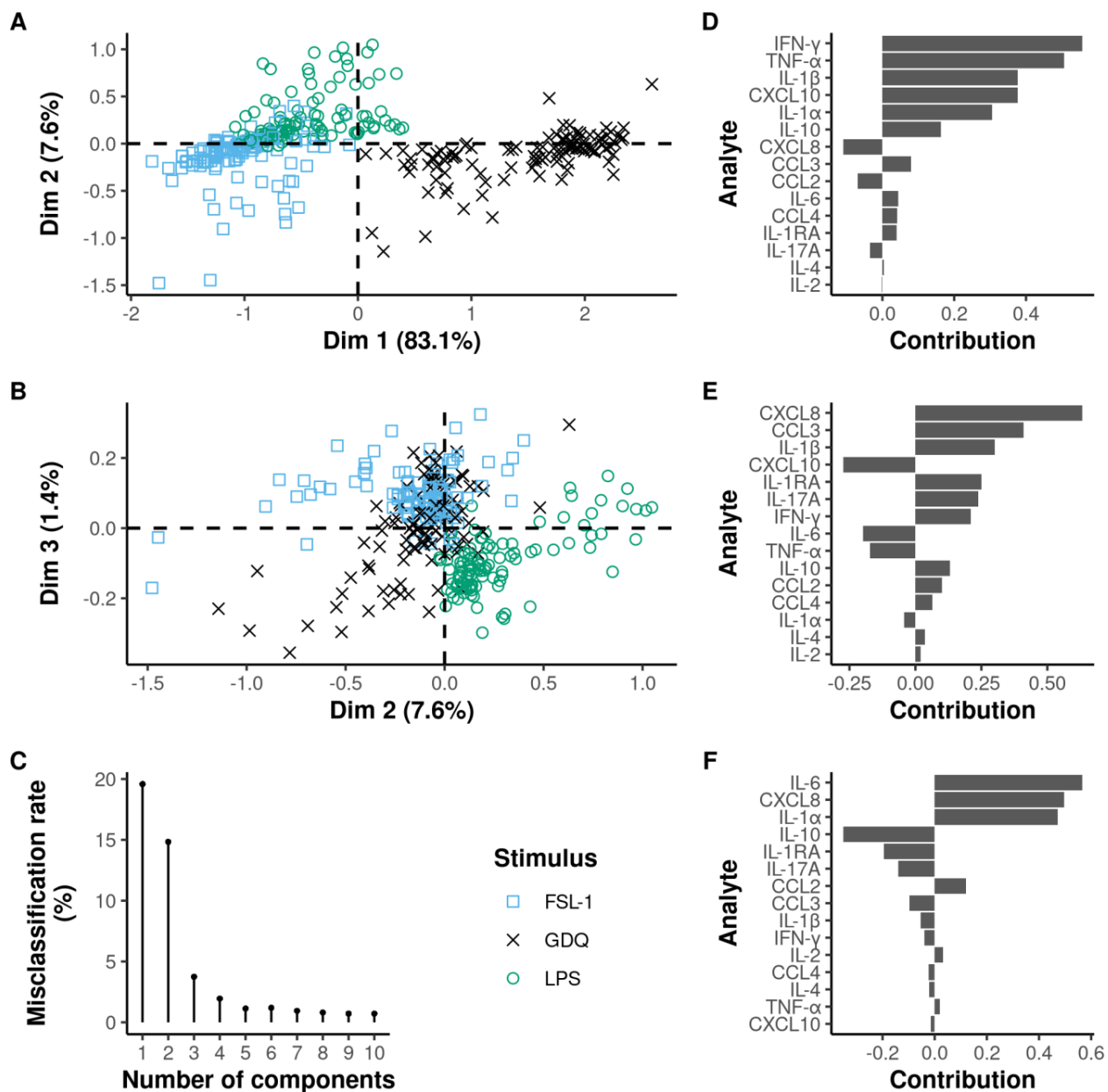
Supplementary Figure 7. Multilevel sparse PLS-DA on bacterial stimuli adjusted MFI values reveals specific patterns of expression according to the bacteria species. On the plot of the individuals (A, B), each dot represents an individual cow and the corresponding stimulus is defined by the different colors and shapes. The x and y-axis correspond to the sparse PLS-DA components. The proportion of variance explained by each principal component is given in brackets. (C) Misclassification rate (MR) achieved given the number of sparse PLS-DA components: only 3 cytokines are sufficient to reach an almost perfect classification rate with 2 (MR = 5.63%) or 3 components (MR = 1.62 %).



Supplementary Figure 8. Multilevel sparse PLS-DA on TLR ligands adjusted MFI values identifies commonalities between TLR2 and TLR4 engagements. On the plots of the individuals (A, B), each dot represents an individual cow and the corresponding stimulus is defined by the different colors and shapes. The x and y-axis correspond to the sparse PLS-DA components. Misclassification rate (MR) achieved given the number of sparse PLS-DA components: only 3 cytokines are sufficient to reach a classification error rate lower than 10% (MR = 8.4 %) on the first two components.



Supplementary Figure 9. Multilevel PLS-DA on bacterial stimuli unadjusted MFI values reveals specific expression patterns depending on the bacteria species. On the plot of the individuals (A), each dot represents an individual cow and the corresponding stimulus is defined by various colors and shapes. The x and y-axis correspond to the first and second PLS-DA components, respectively. The proportion of variance explained by each principal component is written in brackets. The contribution of the cytokines to the first (B) and second (C) principal components are represented by a horizontal barplot. The two first principal components are sufficient to reach an almost perfect misclassification rate (D).



Supplementary Figure 10. Multilevel PLS-DA on TLR ligands unadjusted MFI values identifies commonalities between TLR2/6 and TLR4 engagements. On the plots of the individuals (**A**, **B**), each dot represents an individual cow and the corresponding stimulus is defined by the different colors and shapes. The x and y-axis correspond to the PLS-DA components, respectively. The proportion of variance explained by each principal component is written in brackets. The contribution of the cytokines to the first (**D**), second (**E**) and third (**F**) principal components are represented by a horizontal barplot. The three first principal components are sufficient to reach a misclassification rate below 10% (**C**).

Supplementary Material

Supplementary Table 4. Raw MFI values coefficient of variation (CV) in percentage for each cytokine and stimulation condition. CTL, FSL-1, GDQ, HKEC, HKSA, HKSU and LPS stand for control, fibroblast-stimulating lipopeptide 1, gardiquimod, heat-killed *Escherichia coli*, heat-killed *Staphylococcus aureus*, heat-killed *Streptococcus uberis* and lipopolysaccharide stimuli, respectively.

		Stimulus						
	Analyte	CTL	FSL-1	GDQ	HKEC	HKSA	HKSU	LPS
CV (%)	CCL2	74	27	34	27	37	44	25
	CCL3	205	54	26	30	33	15	28
	CCL4	83	25	15	17	16	13	16
	CXCL8	280	46	60	17	42	34	25
	CXCL10	47	114	33	55	69	65	92
	IFN-γ	38	384	99	155	176	73	258
	IL-10	64	47	37	35	33	33	38
	IL-17A	38	109	49	94	128	94	119
	IL-1RA	65	76	55	62	63	47	59
	IL-1α	45	98	94	46	71	77	102
	IL-1β	19	179	86	64	114	87	118
	IL-2	16	15	13	15	15	13	14
	IL-4	19	19	17	18	19	16	18
	IL-6	45	52	40	43	50	35	47
	TNF-α	172	142	51	76	59	29	125

2.4 Investigation des facteurs génétiques et environnementaux influençant la réponse cytokinique sur sang entier

2.4.1 Cas de la stimulation au LPS

Cette partie de l'étude fera l'objet d'une soumission au *Journal of Animal Science and Biotechnology*. L'article complet est accessible en page 91. Les paragraphes suivants en font la synthèse.

2.4.1.1. Contexte, problématique et objectifs

L'optimisation de la productivité et de la santé des vaches laitières est cruciale pour assurer la durabilité et la rentabilité des exploitations. La compétence immunitaire joue un rôle de première importance dans leur capacité à répondre efficacement aux agents pathogènes, notamment les agents de mammites.

La compétence immunitaire est influencée par une multitude d'interactions complexes entre des déterminants génétiques et environnementaux. Jusqu'à présent, l'exploration de ces interactions est restée relativement limitée.

L'objectif principal de cette étude était donc d'étudier les relations entre la réponse à un test sanguin et les différents facteurs susceptibles de la faire varier. Pour ce faire, un panel de quatorze cytokines a été dosé simultanément suite à une épreuve de stimulation *ex vivo* sur sang entier avec du LPS, ligand du TLR4 couramment utilisé pour activer le système immunitaire. Les dosages des cytokines ont ensuite été mis en relation avec des index génétiques et des caractères phénotypiques relatifs au stade physiologique, à la production laitière, à la santé mammaire et au statut métabolique (cétose) des vaches.

Une meilleure compréhension de ces relations permettrait d'améliorer *in fine* la santé, le bien-être et la productivité des vaches laitières.

2.4.1.2. Matériels et méthodes

Population d'étude, plan expérimental et collecte des données

L'étude a été conduite sur la population de vaches Prim'Holstein issue de la sélection divergente sur la résistance aux mammites présentée dans la section 2.2.1. Parmi ces 107 vaches, deux ont été écartées de l'étude en raison de données incomplètes sur les 14 premiers jours de lactation pour l'une et d'une absence d'évaluation de ses index génétiques pour l'autre.

Elle s'appuie sur un plan expérimental croisé dans lequel chaque vache est son propre témoin. Cependant, l'unité expérimentale recevant le traitement (ajout de LPS) est l'échantillon sanguin et non la vache.

Pour chacune des vaches de l'étude, les index génétiques (index lait (INLAIT), INCELL, index état corporel (INEC) et index longévité fonctionnelle (INLGFO)) ont été estimés par génotypage. Les variables explicatives retenues pour l'étude sont le lait corrigé par les matières grasses et les protéines (FPCM), les SCS, les TB et TP du lait, les concentrations de BHB du lait, le rang de lactation et la gravidité au moment de l'échantillonnage. Afin de prendre en compte un potentiel effet du stade physiologique sur les sécrétions de cytokines, les valeurs de ces variables ont été agrégées sur différentes fenêtres temporelles :

- $FPCM_s$, SCS_s , BHB_s et TB/TP_s correspondant à la valeur disponible la plus proche du moment de l'échantillonnage,
- $FPCM_{305}$, SCS_{305} , BHB_{305} et TB/TP_{305} correspondant à la valeur cumulative du FPCM et aux valeurs moyennes des autres variables sur les 305 premiers jours de lactation,
- BHB_{0-14} , TB/TP_{0-14} , BHB_{50-60} et TB/TP_{50-60} correspondant aux valeurs moyennes des concentrations de BHB et du rapport TB/TP sur les 14 premiers jours de lactation et entre les 50^{ème} et 60^{ème} jours de lactation, correspondant au pic de la lactation, respectivement.

Préparation, stimulation des échantillons et dosage des cytokines

Les étapes de préparation et de stimulation des échantillons ont été décrites en détail dans la section 2.2.3. Pour mémoire, les échantillons sanguins ont été prélevés à 101 ± 11 jours de lactation pour éviter l'immunodépression faisant suite au vêlage.

De même, le protocole employé pour doser les concentrations plasmatiques des cytokines et des chimiokines a été détaillé dans la section 2.2.4. À titre de rappel, le panel de cytokines est composé de cinq cytokines impliquées dans la réponse immunitaire innée (IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-6, TNF- α), cinq cytokines de la réponse immunitaire adaptative (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ et IL-17A) et quatre chimiokines (CCL2, CCL3, CCL4, CXCL10). Les concentrations plasmatiques de CXCL8 n'ont pas été intégrées à l'analyse en raison de valeurs situées en-dehors de la gamme de quantification en situation de stimulation pour de nombreuses vaches.

Analyses statistiques

Dans un premier temps, les relations entre les cytokines, les index génétiques et les variables phénotypiques ont été investiguées à l'aide de modèles de régressions linéaires. Ces derniers ont été ajustés séparément pour une cytokine et une situation données. Chaque situation correspond à une variable dépendante particulière : les concentrations des cytokines en l'absence de stimulation, les concentrations des cytokines en présence de LPS et les différences des concentrations entre les deux situations précédentes (*delta*).

Dans un second temps, une Classification Hiérarchique sur Composantes Principales (HCPC) a été mise en œuvre afin d'identifier des groupes de vaches présentant des profils cytokiniques similaires. Les index génétiques et les variables phénotypiques des vaches des différents *clusters* ont été comparés par des tests de la somme des rangs de Wilcoxon et des tests exacts de Fisher.

2.4.1.3. Résultats

En l'absence de stimulation, les régressions linéaires ont montré que la plupart des concentrations des cytokines étaient associées positivement et de manière signi-

ficative au rang de lactation. Toujours en l'absence de stimulation, l'INCELL et le FPCM₃₀₅ étaient négativement associés à la sécrétion de plusieurs cytokines, telles que l'IL-1 α , l'IL-2, l'IL-4, l'IFN- γ et le CXCL10. En revanche, après stimulation par le LPS, les régressions linéaires ont mis en évidence très peu de relations significatives. Parmi celles-ci, on retrouvait une association positive avec le rang de lactation (IL-1RA, IL-17A et CCL2) et les concentrations de BHB₅₀₋₆₀ (IL-6, CCL3 et CCL4). Ces résultats soulignent l'importance du rang de lactation et de l'état métabolique dans la modulation de la réponse immunitaire chez les vaches laitières.

Dans chaque situation, l'analyse par HCPC a permis d'identifier trois groupes de vaches présentant des profils de sécrétion similaires. Ces *clusters* étaient distribués le long de la première composante principale, expliquant à elle seule 49% (situation *delta*) et 55,6% (situation LPS) de la variance totale, et se différençaient par des niveaux de concentration croissants pour la quasi-totalité des cytokines mesurées. En l'absence de stimulation, le groupe 1 était caractérisé par des niveaux de sécrétion plus faibles et était composé principalement de primipares, tandis que le groupe 3 présentait des concentrations de cytokines plus élevées, des concentrations de BHB_s plus faibles et était principalement composé de multipares. Ainsi, les profils cytokiniques semblent fortement influencés par le rang de parité et le statut métabolique des vaches laitières. Concernant la situation en présence de LPS, le groupe 1 s'est différencié du groupe 2 par un nombre plus élevé de primipares et du groupe 3 par des concentrations plus faibles de BHB₅₀₋₆₀.

Il est intéressant de noter que la plupart des vaches (16/18) qui avaient les concentrations de cytokines les plus élevées en l'absence de stimulation, avaient les concentrations parmi les plus faibles en situation de stimulation par le LPS. Ceci soutient l'hypothèse d'une tolérance au LPS chez ces individus.

2.4.1.4. Discussion et conclusion

Cette étude a mis en lumière les interactions complexes entre la compétence immunitaire et les facteurs génétiques et environnementaux relatifs à la production, la santé mammaire et le statut métabolique des vaches laitières. Contrairement aux études précédentes s'intéressant à la compétence immunitaire, le recours au

dosage des concentrations plasmatiques de nombreuses cytokines a permis d'évaluer non seulement le volet adaptatif de la réponse immunitaire, mais aussi son volet inné. Parmi ces facteurs, le rang de lactation, la production laitière corrigée par les taux butyreux et protéique, l'index génétique pour les cellules somatiques et les concentrations de BHB étaient fortement associés aux sécrétions.

Notre étude a mis en évidence une association positive entre le niveau d'inflammation basale et le rang de lactation. Ce résultat peut être interprété de deux façons : des sécrétions de cytokines élevées favorisent la survie des vaches laitières ou bien les sécrétions basales des cytokines augmentent au fil des lactations, marqueur d'un phénomène d'immunosénescence. Bien qu'une étude longitudinale soit nécessaire pour interpréter rigoureusement l'association précédente, l'immunosénescence étant un phénomène rapporté dans différentes études menées chez la vache laitière (69,70,356,357), un effet du rang de lactation sur les sécrétion basales des cytokines semble plus probable. Si tel est le cas, l'existence d'une immunosénescence impliquerait de prendre en compte la parité dans la gestion de la santé des troupeaux laitiers et explique, en partie, la faible longévité des vaches laitières. De plus, les profils de sécrétion des vaches présentant des index génétiques élevés pour les cellules somatiques suggèrent une réponse immunitaire adaptative modérée, évoquant des aptitudes à développer une réponse immunitaire innée efficace et à la contenir à un niveau local.

En réponse au LPS, les sécrétions des cytokines pro-inflammatoires augmentaient avec le déficit énergétique autour du pic de lactation, évalué via les concentrations de BHB. Ceci pourrait être le signe d'un potentiel effet à long terme du déficit énergétique sur la réponse immunitaire mais les éléments pour l'affirmer manquent.

De plus, une production élevée de lait corrigé par les matières grasses et les protéines était associée à un niveau inflammatoire basal réduit et à une capacité de réponse immunitaire adaptative accrue en réponse au LPS.

Malgré certaines limites liées, en partie, à la taille de l'échantillon d'étude, la combinaison de la stimulation *ex vivo* de sang total avec du LPS et de la technologie Luminex[®] s'est révélée être une approche intéressante pour étudier la compétence immunitaire des vaches et ses relations avec divers caractères de production et

fonctionnels. Des études à plus grande échelle dans des races et des environnements différents sont cependant nécessaires pour généraliser ces résultats.

1 To what extent does bovine whole blood 2 response depend on environmental and 3 genetic factors?

4 Jérémy Lesueur¹, Rachel Lefebvre², Frédéric Launay³, Didier Boichard², Gilles Foucras^{1*}, and
5 Fabien Corbière¹

6 ¹IHAP, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France

7 ²GABI, Université de Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Jouy-en-Josas, France

8 ³Unité expérimentale du Pin, UE 326, INRAE, Borculo, Le Pin au Haras, France

9 * **Correspondence:** Gilles Foucras, gilles.foucras@envt.fr

10 **Abstract**

11 **Background** Immune competence plays a pivotal role in productivity, health, and overall welfare in dairy
12 cattle. This study aimed to investigate the genetic and environmental factors influencing immune
13 competence in dairy cows, with a focus on cytokine secretion patterns and their relationship with lactation
14 rank, milk production, udder health, and ketosis-related traits. An *ex vivo* stimulation of whole blood using
15 lipopolysaccharide (LPS) and Luminex[®] technology-based cytokine assays were employed to assess
16 response profiles in dairy cows from a divergent selection for mastitis resistance.

17 **Results** Cytokine concentrations increased in relation to the lactation rank in the absence of stimulation,
18 highlighting the aging process after just a few lactations in dairy cows. Besides, cows with higher breeding
19 values for somatic cell count exhibited lower CCL3 chemokine secretion and cytokines related to type 2 and
20 type 3 cell-mediated responses, suggesting a biased adaptive response against udder infections. Upon LPS
21 stimulation, higher concentrations of β -hydroxybutyrate (BHB), indicative of negative energy balance, were
22 associated with altered cytokine secretion patterns especially with increased pro-inflammatory cytokines.
23 Additionally, cows with high milk production exhibited reduced basal secretion of inflammatory cytokines and

24 displayed a capacity for a more balanced adaptive immune response under LPS condition. Clustering
25 analyses confirmed the cumulative effect of lactation rank and ketosis on the response patterns.

26 **Conclusions** This study provides novel insights into the factors influencing immune competence in dairy
27 cows, offering potential implications for targeted interventions and breeding strategies to enhance disease
28 resistance and overall animal health in dairy farming practices.

29 **Keywords**

30 Dairy cow, whole blood assay, *ex vivo* stimulation, LPS, cytokines, immunosenescence, udder health, ketosis

31 **1. Background**

32 Maximizing the productivity and health of cows is of paramount importance to ensure sustainable
33 and profitable dairy operations. One key aspect that affects the overall welfare and performance of
34 dairy cows is their immune competence, which influences their ability to mount effective immune
35 responses against pathogens and maintain, among other aspects, udder health.

36 Understanding the factors that contribute to immune competence in dairy cattle is the key to
37 developing strategies to enhance their resistance to diseases and improve overall herd health and
38 welfare. Previous studies have demonstrated that the immunity of dairy cows is influenced by a
39 complex interplay of factors, notably in early lactation, but their description remains overlooked.

40 In this context, the present study employed a novel approach combining whole blood stimulation
41 and a Luminex® technology-based assay to determine cytokine response in dairy cattle. Luminex®
42 technology allows for the simultaneous measurement of multiple cytokines, enabling a
43 comprehensive evaluation of the immune response profile. This approach provides a powerful tool
44 to investigate the relationships between cytokine secretion patterns and individual traits.

45 The primary objective of this study was to investigate the genetic and environmental factors that
46 influence immune competence in dairy cattle. Specifically, we aimed to assess the relationship
47 between cytokine secretions and lactation rank, milk production, health with infectious and
48 metabolic traits.

49 To achieve this aim, we employed an approach combining precise immune phenotyping and data
50 from well-characterized cows with genetic evaluation including several genomic breeding values
51 for different traits of interest and dense phenotyping of traits related to lactation and health. These
52 cows were issued from an experimental design with a wide range of mastitis-related genomic values
53 in a divergent selection for mastitis resistance. To capture the cow's immune response under these
54 relevant conditions, we used a whole blood assay using lipopolysaccharide (LPS) as an activating
55 agent. By simulating the immune response in controlled settings, we were able to assess the
56 capacity of the cow to respond to this stimulus related to innate immunity that is commonly used to
57 evaluate inflammatory and immune responses in various species, including cattle.

58 Here, we provide novel insights into the factors influencing the immune competence of dairy cows.
59 This knowledge can contribute to the development of targeted interventions and breeding strategies
60 aimed at improving the health, welfare, and productivity of dairy cows and promoting more
61 sustainable and profitable dairy farming practices.

62 **2. Methods**

63 **2.1. Study population**

64 The study population consisted of 105 Holstein-Friesian cows that were issued from a divergent
65 selection on mastitis traits. Sires used to create the two divergent lines were chosen based on their
66 genomic breeding values for Somatic Cell Count (SCC) and clinical mastitis. They were then
67 divided into two categories: resistant if the average of the two previous breeding values was greater
68 than 1, and control if the average was between -1.5 and -0.5, the remaining bull were not used. The
69 first batch of cows was randomly inseminated with the selected sires. To achieve divergence, their
70 daughters were then inseminated with a sire belonging to the same category as their father.

71 All cows were housed in a free stall barn at the Pin-au-Haras farm, an experimental dairy cow
72 facility operated by the French National Research Institute for Agriculture, Food and Environment
(INRAE). They were fed with a total mixed ration distributed twice a day. Water was available at

73 will. Cows were milked twice a day at approximately 7:30 am and 4:30 pm. Calvings were spread
74 over the year.

75 Cows in the first (n=42), second (n=43), and third or higher (n=20) lactation will be referred to as
76 L_1 , L_2 , and $L_{\geq 3}$, respectively. Among them, 26 cows were pregnant at the time of sampling, which
77 occurred at an average of 23 ± 18 days of pregnancy. The cows were confirmed to be free from
78 zoonotic infections such as brucellosis, tuberculosis, and bovine leukosis. Their health status was
79 assessed daily throughout the entire lactation period. From two weeks before to two weeks after
80 blood sampling, six cases of clinical mastitis, one case of cystitis, and one case of lameness were
81 reported and the affected cows were subsequently removed from the study. The cows were managed
82 in a single herd, ensuring that they were exposed to the same environmental factors.

2.2. Experimental design

83 The experimental design of the study followed a cross-over design where each cow served as its
84 own control. The treatment involved two modalities: stimulation with a predefined concentration of
85 lipopolysaccharide (LPS) or a null condition without stimulation.

2.3. Data collection

86 2.3.1. Husbandry data

87 2.3.1.1. Breeding values

88 The cows were genotyped with the EuroG10k chip (Illumina Inc., San Diego, CA). The breeding
89 values for milk yield (gEBV_{MY}), SCC (gEBV_{SCC}), body condition score (gEBV_{BCS}), and functional
90 longevity (gEBV_{FL}) were predicted from the genotyping data according to the French scale (1).

91 2.3.1.2. Phenotypic data

92 Phenotypic data used in the study included milk yield, fat, and protein content of milk, SCC, milk
93 β -hydroxybutyrate (BHB) concentration, and pregnancy status at the time of sampling.

94 Milk yields were recorded at each milking session while milk composition (fat, protein and BHB)
95 was determined twice a week using mid-infrared spectroscopy. SCC was also measured twice a

96 week with a somatic cell counter (Fossomatic model 90, Foss Food Technology, Hillerod,
97 Denmark).

98 Pregnancy status was determined by measuring the blood progesterone concentration.

99 SCC values were normalized through somatic cell scores (SCS) conversion (2):

$$100 \quad \text{SCS} = \log_2 \left(\frac{\text{SCC}}{100000} \right) + 3$$

101 To ensure fair comparisons between cows and account for the energy used to produce milk, the fat-
102 and protein-corrected milk (FPCM) was used instead of the raw milk yield. FPCM represents the
103 quantity of standardized milk containing the same amount of energy as the raw milk (3):

$$104 \quad \text{FPCM} = my \times (0.337 + 0.116 \times fc + 0.06 \times pc)$$

105 where my corresponds to the daily milk yield (kg), fc and pc correspond to the fat and protein
106 content in percent by weight (%).

107 To account for the potential effects of the physiological stages on cytokine secretion, FPCM, SCS,
108 BHB, and milk fat to protein ratio (FPR) were calculated over several temporal windows:

- 109 • FPCM_s, SCS_s, BHB_s, and FPR_s corresponding to the nearest values to the blood drawing,
- 110 • FPCM₃₀₅, SCS₃₀₅, BHB₃₀₅, and FPR₃₀₅ corresponding to the cumulative FPCM, the average
111 SCS, BHB, and FPR over the first 305 days in milk, respectively,
- 112 • BHB₀₋₁₄, FPR₀₋₁₄, BHB₅₀₋₆₀, and FPR₅₀₋₆₀ corresponding to the average BHB concentrations
113 and FPR over the first fourteen days in milk and between the 50th and the 60th days in milk,
114 corresponding to the beginning and peak of the lactation, respectively.

115 2.3.2. Sample preparation and stimulation

116 Blood samples were collected at 101±11 days post-calving to avoid the period of the highest
117 incidence of infectious diseases due to immune depression after calving and stimulated *ex vivo* as
118 previously described (4). Samples were collected over eight sessions from March 2017 to January
119 2018.

2.4. Cytokine and chemokine measurement

120 The analytes of interest were five cytokines involved in the innate immune response (IL-1 α , IL-1 β ,
121 IL-1RA, IL-6, and TNF- α), five cytokines of the adaptive response (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , and
122 IL-17A), and four chemokines (CCL2 (MCP1), CCL3 (MIP1 α), CCL4 (MIP1 β), and CXCL10
123 (IP10)).

124 Cytokines and chemokines median fluorescence intensities (MFI) were measured using a custom
125 15-plex bovine cytokine assay from Merck-Millipore (SPRCUS617, Milliplex® xMAP®, Merck-
126 Millipore, France) and the MAGPIX® system (Luminex®) as previously described. MFI were
127 determined by the xPONENT software (version 4.2.1324.0, Luminex Corp, Austin TX USA).
128 Cytokines and chemokines MFI were converted to concentrations using dose-response curves
129 modeled by 4 or 5 parameters logistic functions, as appropriate.

2.5. Descriptive statistics

130 As age influences numerous production and physiological traits, continuous variables included in
131 the linear regressions (described below) were compared between lactation ranks (1, 2, and ≥ 3)
132 using Wilcoxon rank sum tests and categorical variables were compared using Fisher exact tests.
133 Multiple comparison corrections with Benjamini-Hochberg method were applied.

2.6. Statistical analyzes

134 2.6.1. Linear regression models

135 The relationships between, on the one hand, cytokine concentrations (dependent variables) and, on
136 the other hand, breeding values and phenotypic data (independent variables) were investigated
137 using linear regression models.

138 A model was fitted separately for each cytokine in each condition (CTL, LPS, and difference of
139 concentration between both conditions, referred below as to *delta* values). To avoid redundancy of
140 information, correlations between independent variables were analyzed beforehand using the
141 Pearson correlation coefficient. In the case of a high correlation (> 0.7) between two variables, the

142 one minimizing the Akaike Information Criterion (AIC) was preferred. Cytokine concentrations
143 were \log_{10} -transformed to reduce the heteroscedasticity inherent in immunoassay. Continuous
144 independent variables were centered and scaled to ease the interpretation of their relative effect on
145 the dependent variables.

146 The initial models included all breeding values ($gEBV_{MY}$, $gEBV_{SCC}$, $gEBV_{BCS}$, and $gEBV_{FL}$),
147 production ($FPCM_s$ and $FPCM_{305}$) and functional traits (SCS_{305} , BHB_{14} , BHB_{50-60} , BHB_s), and parity
148 rank as independent variables.

149 A backward variable selection was performed with the likelihood ratio test as the selection criterion
150 with significance level set at 0.05. Finally, to account for multiple comparisons, the p-values of
151 coefficient estimates were corrected using the Benjamin-Hochberg method within each situation
152 (i.e. CTL, LPS, and *delta* values). The goodness of fit of each model was assessed through
153 standardized residuals and quantile-quantile diagrams.

154 2.6.2. Clustering Analysis

155 To investigate the possibility of cows sharing similar cytokine response profiles, a clustering
156 analysis was performed using the Hierarchical Clustering on Principal Components (HCPC)
157 method. This analysis aimed to identify distinct clusters of cows based on their cytokine secretion
158 patterns.

159 The cytokine concentrations were centered and scaled to ensure comparability and reduce the
160 influence of scale differences.

161 To reduce the dimensionality of the cytokine secretion data, a Principal Component Analysis (PCA)
162 was performed. The first principal components (PC) that explained, together, more than 60% of the
163 total variance were retained for subsequent clustering analysis.

164 The retained PC from the PCA were then used as input variables for the HCPC method. The number
165 of clusters was determined with the higher relative loss of inertia. However, if the suggested

166 partition contained small clusters (less than 5 individuals), the number of clusters was reduced until
167 it met this latter criterion.

168 The characteristics of the cows comprising the different clusters were compared pairwise using
169 Wilcoxon rank sum tests and Fisher tests for continuous and categorical variables, respectively.
170 Multiple comparison corrections with the Benjamini-Hochberg method were applied.

2.7. Statistical software

171 All statistical analyses were performed using R (version 3.6.3)(5). The dose-response curves were
172 fitted using the *drLumi* package (version 0.1.2)(6), an R package dedicated to multiplex
173 immunoassay data analysis. The variable selection was done using the *stepCriterion* function from
174 the *glmtoolbox* R package (7), a set of tools to analyze generalized linear models. The cluster
175 analysis was conducted with *FactoMineR* (8), an R package designed for multivariate exploratory
176 data analysis and data mining.

177 3. Results

3.1. Individual characteristics according to the lactation rank

178 The main characteristics of the study group are hereby presented (**Table 1**). Most breeding values
179 of L_1 , L_2 , and $L_{\geq 3}$ cows were not significantly different except that L_1 cows had a significantly lower
180 breeding value for SCC ($P < 0.001$) and the lowest breeding value for body condition score, with a
181 significant difference with the L_2 cohort ($P < 0.05$). In agreement with the breeding values for SCC,
182 L_1 appeared to have the highest SCS_{305} ($P < 0.01$) and SCS_s ($P < 0.001$).

183 $L_{\geq 3}$ cows had a significantly higher 305-day milk yield than other cows ($P < 0.01$), as milk
184 production generally peaks at this age. However, the lactation ranks did not differ in $FPCM_{305}$ ($P =$
185 0.21) or $FPCM_s$ ($P = 0.14$).

186 Around the peak of the lactation curve (6 to 8 weeks after calving), milk BHB concentrations
187 differed significantly between L_1 and L_2 cows ($P < 0.01$), the latter having the highest
188 concentrations. This difference was not observed for the FPR ($P = 0.42$). Besides, around the date

189 of the whole blood assay (WBA), BHB concentrations were significantly higher for L₁ than L_{≥3} (*P*
190 < 0.01). Similarly, the FPR values for L₁ cows were significantly higher than for other cohorts (*P* <
191 0.001).

3.2. Cytokine concentrations

192 As previously shown (4), the LPS stimulation induced cytokine secretions and their concentrations
193 were globally higher than in the absence of stimulation (CTL condition) (**Figure 1**). Briefly, the CC
194 chemokines had the highest basal and stimulated concentrations, with CCL2 and CCL3 seemingly
195 reaching a ceiling under stimulation. CCL4 had the highest difference between the two conditions
196 (*delta* value). CXCL10 concentrations were low, both in the absence and presence of LPS
197 stimulation. Despite low basal secretions, IFN- γ had the largest secretion range under stimulation
198 while IL-17A had the lowest basal secretion and *delta* values. IL-2 and IL-4 had relatively low
199 *delta* values. Among the cytokines, IL-1RA had the highest concentrations under stimulation and
200 *delta* values, as well as TNF- α , which reached high concentrations after LPS stimulation.

3.3. Lactation rank has a major effect on basal cytokine levels

201 The relationships between cytokine concentrations and traits related to milk yield, udder health,
202 ketosis, and lactation rank were investigated using linear regression models and results are
203 summarized in **Figure 2**. In the CTL condition, the lactation rank, the genomic value for SCC
204 (gEBV_{SCC}), and the FPCM were significantly associated with the cytokine concentration levels.
205 Overall, the cytokine concentrations increased significantly according to the lactation rank, except
206 for TNF- α , IL-6, and CXCL10. gEBV_{SCC} was negatively associated with IL-4, IL-1 α , IL-17A and
207 CCL3. BHB₁₄ and BHB₃₀₅ were respectively negatively associated with IL-1 α and IL-6 secretions.
208 FPCM₃₀₅ was negatively associated with the secretion of five cytokines: IL-1 α , IL-2, IL-4, IFN- γ ,
209 and CXCL10. Interestingly, FPCM_s was positively associated with IFN- γ and CXCL10 but
210 negatively associated with IL-17A.
211 For the LPS condition, fewer significant relationships between cytokine concentrations and animal
212 traits were found. The lactation rank was positively associated with IL-1RA, IL-17A, and CCL2

9

213 concentrations. BHB₅₀₋₆₀ was positively associated with IL-6, CCL4, and CCL3 concentrations,
214 while BHB was negatively associated with CCL3 concentrations. FPCM₃₀₅ was positively and
215 negatively associated with IL-17A and IL-4 concentrations, respectively. gEBV_{FL} was negatively
216 associated with IL-4.

217 The differences in secretion between the conditions (*delta* values) showed only one significant
218 relationship which was a positive association between lactation rank and IL-1RA concentration.

219 The previous analyses allowed us to identify redundant relationships between cytokine production
220 and some specific traits, especially the lactation rank, FPCM, and gEBV_{SCC} in the absence of
221 stimulation. Altogether these results suggest a high variability of response amongst cows and,
222 potentially, cows sharing the same response profile. This was further investigated by carrying out
223 cluster analyses (HCPC).

3.4. Response profiles are related to the metabolic status and the lactation rank

224 3.4.1. Contributing cytokines to the clusterization

225 For the two conditions (CTL and LPS) and *delta* values, the first two principal components (PC)
226 explained more than 60% of the overall cytokine concentration variance (CTL: 61.9% (**Figure 3A**),
227 LPS: 69.3% (**Figure 3D**) and *delta*: 65.5% (**Figure 3G**)).

228 In the CTL situation, the cytokines contributing the most to the first PC were CCL4, IL-1RA,
229 CCL3, IL-17A, CCL2, IL-1 β , and IL-2 (**Figure 3B**). The cytokines contributing the most to the
230 second PC were CXCL10, IL-4, IL-10, CCL2, IL-2, and CCL4 (**Figure 3C**). In the LPS condition,
231 the cytokines contributing the most to the first PC were IL-1 α , TNF- α , IL-17A, CCL3, CXCL10,
232 IFN- γ , IL-1RA, IL-1 β and CCL4 (**Figure 3E**) while IL-4, IL-2, CCL2, IFN- γ and IL-1 β
233 contributed to the second PC (**Figure 3F**).

234 For the *delta* values, the cytokines contributing the most to the first PC were IL-1 α , TNF- α , IL-1 β ,
235 IFN- γ , CXCL10, IL-10, IL-17A and CCL4 (**Figure 3A**). The cytokines contributing the most to the
236 second PC were CCL2, IL-2 and IL-4.

237 In each condition, the hierarchical clustering identified three clusters of unequal size. In the CTL
238 and LPS conditions, the clusters aligned along the first PC, meaning they differed most in the
239 overall level of secretion of almost all cytokines (**Figures S1 and S2**). For *delta*, cluster 3
240 comprised only 8 cows that clearly differed from the other two by higher values on the first
241 component, while cluster 1 (n = 55) and 2 (n = 42) mostly differed on the second PC (**Figure S3**).
242 Further characterization of the clusters was performed by comparing production and functional
243 traits using pairwise Wilcoxon rank sum tests and Fisher exact tests (**Figure 5**). The comparisons
244 revealed significant differences in BHB_s (0.03 and 0.02 mmol.L⁻¹) and BHB₅₀₋₆₀ (0.03 and 0.05
245 mmol.L⁻¹) concentrations between clusters 1 and 3 for both CTL and LPS conditions, respectively.
246 Additionally, in the CTL condition, cluster 1 contained a higher proportion of L₁ cows (n = 28,
247 62.2%) than cluster 2 (28.6%, *P* < 0.01) and cluster 3 (11.1%, adjusted *P* < 0.001), while cluster 3
248 contained a higher proportion of L_{≥3} cows (n = 9, 50.0%) than cluster 1 (6.7%, adjusted *P* < 0.001)
249 and cluster 2 (19.0%, adjusted *P* = 0.04). These findings support the previous results obtained from
250 linear regression models, indicating an increasing gradient of cytokine secretion correlated to the
251 lactation rank in the absence of stimulation. With LPS, cluster 1 was still characterized by a higher
252 proportion of L₁ cows (60.7%) than cluster 2 (n = 16, 27.1%, adjusted *P* < 0.05).

253 3.4.2. Cows distribution amongst clusters

254 To determine if cows were evenly distributed amongst clusters, we compared cluster composition
255 between conditions and looked for cluster correspondence (described as cow trajectory) (**Figure 4**).
256 Interestingly, 21 of 28 cows (75%) in the low secretion level cluster under LPS stimulation (cluster
257 LPS 1) had also low basal secretion levels under the CTL situation (cluster CTL 1) and conversely
258 only 3 of 18 cows (16.7%) in the high secretion level cluster under CTL situation (cluster CTL 3)
259 were also part of the high secretion level cluster under LPS stimulation (cluster LPS 3). These
260 distributions differed significantly from random (*P* < 0.001). The fact that most of the cows in the
261 CTL 3 cluster (n = 13, 72.2%) were among the cows with the lowest *delta* values (*delta* 1 cluster)

262 also indicates that the cows with the highest basal secretion levels were among the poorest
263 responders to LPS stimulation.

264 Finally the LPS cluster 3 and the *delta* cluster 3 were composed of individuals that originated from
265 each of the different CTL clusters indifferently.

3.5. Discussion

266 The present study aimed to investigate the genetic and environmental factors influencing immune
267 responsiveness to LPS in dairy cattle, with a focus on cytokine secretion patterns and their
268 relationship with lactation rank, milk production, and health traits like mastitis and ketosis. Previous
269 methods developed to assess immune competence relied on adaptative immune response upon
270 immunization (9–11), while innate immunity plays a pivotal role in infectious diseases, especially
271 mammary infections (12,13). To our knowledge, our study is the first one investigating bovine
272 immune competence using a dosage of a wide panel of cytokines after a whole blood assay. It
273 allowed us to gain valuable insights into the bovine innate and adaptative immune responses.

274 Firstly, we observed a positive association between cytokine concentrations and the parity in the
275 absence of stimulation, highlighting the complex interplay between lactation and immunity in dairy
276 cows. This relationship is consistent with other studies which reported an increase in baseline
277 inflammation with parity characterized by higher serum concentrations of TNF- α , IL-6, IL-10,
278 TGF- β (14), IL-17A (15), and IFN- γ (15,16) in multiparous compared to primiparous cows. This
279 phenomenon was described in other species and is known as *inflammaging* (17–20), part of a
280 broader phenomenon known as *immunosenescence* (18,21). The latter was also described by several
281 studies conducted on transcriptomics data from Holstein Friesian cows. Notably, one study carried
282 out by RNA-seq transcriptomics on leucocytes reported numerous differentially-expressed genes
283 between parity ranks (22). L₁ cows were characterized by an up-regulation of genes involved in
284 innate immune response, cytokine secretion regulation (IL10, CD14, FGR, and IL17RC), T
285 lymphocytes development and function (CCR7, CD27, IL17R, CAMK4, CD28), and fatty acids β -
286 oxidation. L_{≥3} cows were characterized by an up-regulation of genes involved in innate immune

287 response (e.g. TLR2), neutrophil degranulation, immune defense proteins (LYZ, CTSZ, SREBF1,
288 GRN, ANXA5, ADARB1) and glycolysis. The switch in energetic metabolism along the parity rank
289 is also a strong marker of *inflammaging*. Indeed, resting immune cells predominantly use fatty acids
290 β -oxidation and oxidative phosphorylation to efficiently but slowly generate ATP molecules. Upon
291 activation during inflammation, they switch to glycolysis, to less efficiently but more quickly
292 generate ATP fuels (23–25). Globally, all transcriptomic changes confirmed a heightened activation
293 of the immune system and inflammation baseline with higher parity. Although the underlying
294 mechanism of *inflammaging* is not fully decrypted, it seems to be the result of (i) the persistence of
295 senescent cells, (ii) accumulation of malformed proteins, (iii) leaky gut (26), (iv) a higher number of
296 memory T lymphocytes and a decrease of naive T-helper cells in peripheral blood (27) and/or (v)
297 epigenetic changes (28). Some of those causes were actually described in Holstein Friesian cows.
298 For instance, age-related alterations in peripheral leukocytes population such as a decrease in $\gamma\delta$ T
299 cell activity (16), and a higher B cell (15) but a lower T cell proliferative response (15,29), were
300 also reported. Concerning age-related epigenetic changes, some of the changes described in humans
301 are consistent with the increase in cytokine secretions observed in our study. Especially, age-related
302 loss of methylation of CpG motifs is reported like for the TNF promoter of peripheral blood
303 leukocytes (30). This mechanism is likely to occur in dairy cows and could explain the increase in
304 TNF- α secretion with the parity. Besides, those epigenetic changes are associated with long-term
305 effects on innate immune cell functions, termed *trained immunity* (31,32), whose effects could be
306 beneficial or detrimental depending on the conditions.

307 Another transcriptomics study was conducted on hepatic tissues from Holstein Friesian cows (33).
308 Being the major source of acute phase proteins, the liver plays a pivotal role in innate immune
309 response (34). This study demonstrated that liver aging was greatly influenced by the high
310 metabolic demand stemming from successive lactations. The differential gene expression between
311 older (more than 4 lactations) and primiparous cows revealed an impaired immune competence in
312 the older cows. Especially, genes involved in antimicrobial peptides and LPS binding protein

313 productions were up-regulated in older cows, suggesting they are more frequently challenged by
314 pathogens, maybe due to latent or chronic diseases (35,36), or a lower immunocompetence when
315 facing infection.

316 Furthermore, our study revealed an association between breeding values for SCC and cytokine
317 secretions. Cows with higher breeding values for SCC exhibited lower secretions of CCL3
318 chemokine and cytokines involved in Th2 and Th17 cell-mediated responses. CCL3 is known to
319 exert an attraction on neutrophils (37), macrophages (38), and various T-lymphocytes (39). These
320 cells are the main contributors to the SCC (40). Breeding values for SCC being negatively
321 correlated with SCC, lower CCL3 concentrations in cows with high breeding values for SCC is
322 consistent. Th2 and Th17 cell-mediated responses are components of the adaptive immune
323 response. This could mean that cows with high breeding values for SCC manage to develop an
324 efficient innate immune response to tackle udder infections. Moreover, in our study, cytokine
325 assessments were carried out on peripheral blood. So, in the absence of stimulation, the cytokine
326 concentrations reflected the systemic inflammatory/immune state of the cows at the time of blood
327 sampling. Hence, a lower adaptive immune response could be explained by the potential capacity of
328 high breeding-values cows to regulate inflammation at the local level. Another possible explanation
329 could be the presence of other protective mechanisms or increased tolerance to pathogens resulting
330 in reduced immune activation (41,42).

331 Cows with higher concentrations of BHB, indicative of some negative energy balance, exhibited
332 altered cytokine secretion patterns. Notably, in the presence of LPS stimulation, cows that had high
333 BHB concentrations when the milk production peaked at 40-60 days in milk, showed increased
334 secretions of pro-inflammatory cytokines. This finding suggests a potential long-term effect of
335 negative energy balance on the immune response to Gram-negative bacteria. Transcriptomic
336 analysis of neutrophils in dairy cows suffering from metabolic stress reported downregulation of
337 genes linked to apoptosis while genes involved in cell survival were up (43). These changes suggest

338 that neutrophils survive longer during a metabolic imbalance and that could explain the lingering
339 effect of negative energy balance on the immune response.

340 Moreover, our study revealed an association between milk production and cytokine secretion. Cows
341 with high FPCM throughout lactation exhibited reduced secretion of several cytokines in the
342 absence of stimulation, indicating lower basal secretion levels. However, in the presence of LPS,
343 these same cows exhibited higher concentrations of IL-17A, suggesting a capacity to deploy a
344 tailored adaptive immune response to extracellular pathogens. This finding suggests that cows with
345 high milk yield throughout the lactation may have a more balanced adaptive immune response.

346 Interestingly, in the LPS-stimulated condition, cytokines involved in the innate immune and
347 inflammatory responses, and Th17 response appeared to contribute the most to the PCA axes,
348 highlighting their crucial role to handle infection to Gram-negative bacteria. In the specific case of
349 LPS stimulation, elevated cytokine secretions (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) are associated with a
350 reduced blastogenic response of PBMC and an increased susceptibility to diseases during the
351 transition period (41). If this observation can be transposed to our sampling period, which is likely,
352 these findings would mean the first PC reflects the cows susceptibility to diseases.

353 Our clustering analysis provided further insights into cytokine secretion patterns related to lactation
354 rank and BHB concentrations. Indeed, we observed a gradient of cytokine concentrations increasing
355 with parity which is consistent with the results of the linear model regressions. These findings
356 probably confirm a cumulative effect of lactation on the immune system. Additionally, in the LPS-
357 stimulated condition, we observed a gradient of cytokine secretion increasing with BHB
358 concentration at the peak of the lactation curve, corroborating the lingering effect of negative
359 energy balance on the immune response to LPS stimulation.

360 Despite interesting findings that are in strong agreement with previous studies, several limitations
361 should be taken into consideration for interpretation. First, although we assayed one hundred cows,
362 the sample size remains relatively small, and a single herd was considered. Although the group of

363 dairy cows was part of a divergent selection experiment for mastitis susceptibility, a larger
364 multicentric sample size would provide more statistical power and is needed for the validation of
365 these results. Such a study would also help identify some other relationships between cytokines and
366 variables that were not considered here due to lack of significance in our experimental design.
367 Moreover, the imbalance in the distribution of cows amongst lactation ranks did not permit to
368 evaluate the interactions with other variables. Besides, breed (44) and environmental factors (45–
369 47) have been shown to influence the immune response and patterns of cytokine response; so
370 caution should be exercised when extrapolating these findings to other breeds or breeding systems.
371 In our study, we used *ex vivo* stimulation of whole blood samples with LPS to assess cytokine
372 responses. While this approach allows for controlled experimental conditions, it may not fully cover
373 the complex relationship between immune and non-immune cells and the dynamics of the *in vivo*
374 immune response. Furthermore, our study design was cross-sectional while a longitudinal study
375 would provide a more comprehensive understanding of the changes in cytokine secretion
376 throughout lactation and physiological stages, especially the period around calving.
377 Although the panel of cytokines has been shown to represent the core of the blood response and
378 provided valuable insights, there are numerous other cytokines and immune markers, such as acute
379 phase proteins (48), that could contribute to a more comprehensive understanding of immune
380 regulation in dairy cows. Moreover, LPS is known to activate specifically TLR4 while there are
381 several other TLRs and signaling pathways (49), such as TLR2 (50), which deserve to be
382 investigated using whole bacteria or other TLR-specific ligands as previously shown (4).
383 Finally, readers should interpret results from our clustering analyses with caution. Although the
384 cluster membership provided insights into patterns of cytokine secretion, it is based on statistical
385 algorithms and may not fully capture the biological complexity and interactions amongst cytokines.
386 By acknowledging these limitations, we can identify areas for future research. Besides, considering
387 the practical implications of the findings, future studies could explore the potential application of
388 immune competence assessment through cytokine detection in breeding programs and management

389 practices to improve disease resistance and overall animal health. For this purpose, a Genome-Wide
390 Association Study (51) should help to identify the genetic determinants influencing the cytokine
391 patterns observed in our study and to gain more insights into the modulation TLR4 signaling
392 pathway.

393 **4. References**

- 394 1. Boichard D, Guillaume F, Baur A, Croiseau P, Rossignol MN, Boscher MY, et al. [Genomic](#)
395 [selection in French dairy cattle](#). *Animal Production Science*. 2012;52(3):115.
- 396 2. Wiggans GR, Shook GE. [A Lactation Measure of Somatic Cell Count](#). *Journal of Dairy*
397 *Science*. 1987 Dec;70(12):2666–72.
- 398 3. FAO. Greenhouse Gas Emissions from the Dairy Sector: A Life Cycle Assessment. Rome:
399 Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2010.
- 400 4. Lesueur J, Walachowski S, Barbey S, Cebron N, Lefebvre R, Launay F, et al. [Standardized](#)
401 [Whole Blood Assay and Bead-Based Cytokine Profiling Reveal Commonalities and Diversity of the](#)
402 [Response to Bacteria and TLR Ligands in Cattle](#). *Frontiers in Immunology*. 2022 May;13:871780.
- 403 5. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R
404 Foundation for Statistical Computing; 2023.
- 405 6. Sanz H, Aponte JJ, Harezlak J, Dong Y, Ayestaran A, Nhabomba A, et al. [drLumi: An open-](#)
406 [source package to manage data, calibrate, and conduct quality control of multiplex bead-based](#)
407 [immunoassays data analysis](#). Tetteh KKA, editor. *PLOS ONE*. 2017 Nov;12(11):e0187901.
- 408 7. Vanegas LH, Rondón LM, Paula GA. Glmttoolbox: Set of tools to data analysis using
409 generalized linear models. 2023.
- 410 8. Lê S, Josse J, Husson F. [FactoMineR: A package for multivariate analysis](#). *Journal of*
411 *Statistical Software*. 2008;25(1):1–18.
- 412 9. Aleri JW, Hine BC, Pyman MF, Mansell PD, Wales WJ, Mallard B, et al. [Associations](#)
413 [between immune competence, stress responsiveness, and production in Holstein-Friesian and](#)

- 414 [Holstein-Friesian Jersey heifers reared in a pasture-based production system in Australia](#). Journal of
415 Dairy Science. 2019 Apr;102(4):3282–94.
- 416 10. Hine BC, Bell AM, Niemeyer DDO, Duff CJ, Butcher NM, Dominik S, et al. [Associations](#)
417 [between immune competence phenotype and feedlot health and productivity in Angus cattle](#).
418 Journal of Animal Science. 2021 Feb;99(2):skab016.
- 419 11. Reverter A, Hine BC, Porto-Neto L, Li Y, Duff CJ, Dominik S, et al. [ImmuneDEX: A](#)
420 [strategy for the genetic improvement of immune competence in Australian Angus cattle](#). Journal of
421 Animal Science. 2021 Mar;99(3):skaa384.
- 422 12. Bronzo V, Lopreiato V, Riva F, Amadori M, Curone G, Addis MF, et al. [The Role of Innate](#)
423 [Immune Response and Microbiome in Resilience of Dairy Cattle to Disease: The Mastitis Model](#).
424 Animals. 2020 Aug;10(8):1397.
- 425 13. Thompson-Crispi K, Atalla H, Miglior F, Mallard BA. [Bovine Mastitis: Frontiers in](#)
426 [Immunogenetics](#). Frontiers in Immunology. 2014 Oct;5.
- 427 14. Zhang G, Wang Y, Luo H, Qiu W, Zhang H, Hu L, et al. [The Association Between](#)
428 [Inflammaging and Age-Related Changes in the Ruminant and Fecal Microbiota Among Lactating](#)
429 [Holstein Cows](#). Frontiers in Microbiology. 2019 Aug;10:1803.
- 430 15. Souza FN, Santos KR, Ferronato JA, Ramos Sanchez EM, Toledo-Silva B, Heinemann MB,
431 et al. [Bovine-associated staphylococci and mammaliococci trigger T-lymphocyte proliferative](#)
432 [response and cytokine production differently](#). Journal of Dairy Science. 2023 Apr;106(4):2772–83.
- 433 16. Ohtsuka H, Uematsu M, Saruyama Y, Ono M, Kohiruimaki M, Ando T, et al. [Age-Related](#)
434 [Alterations in Peripheral Leukocyte Population of Healthy Holstein Dairy Cows during the Pre-](#)
435 [Calving Period](#). Journal of Veterinary Medical Science. 2009;71(8):1121–4.
- 436 17. Day MJ. [Ageing, Immunosenescence and Inflammaging in the Dog and Cat](#). Journal of
437 Comparative Pathology. 2010 Jan;142:S60–9.

- 438 18. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, et al. [Inflamm-](#)
439 [aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence](#). Annals of the New York Academy of
440 Sciences. 2006 Jan;908(1):244–54.
- 441 19. Garschall K, Flatt T. [The interplay between immunity and aging in Drosophila](#).
442 F1000Research. 2018 Feb;7:160.
- 443 20. Siard-Altman MH, Harris PA, Moffett-Krotky AD, Ireland JL, Betancourt A, Barker VD, et
444 al. [Relationships of inflamm-aging with circulating nutrient levels, body composition, age, and](#)
445 [pituitary pars intermedia dysfunction in a senior horse population](#). Veterinary Immunology and
446 Immunopathology. 2020 Mar;221:110013.
- 447 21. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B. [The aging of the immune system](#).
448 Transplant International. 2009 Nov;22(11):1041–50.
- 449 22. Buggiotti L, Cheng Z, Salavati M, Wathes CD, the Genotype plus Environment Consortium,
450 Fahey A, et al. [Comparison of the transcriptome in circulating leukocytes in early lactation between](#)
451 [primiparous and multiparous cows provides evidence for age-related changes](#). BMC Genomics.
452 2021 Dec;22(1):693.
- 453 23. Batista-Gonzalez A, Vidal R, Criollo A, Carreño LJ. [New Insights on the Role of Lipid](#)
454 [Metabolism in the Metabolic Reprogramming of Macrophages](#). Frontiers in Immunology. 2020
455 Jan;10:2993.
- 456 24. Puleston DJ, Villa M, Pearce EL. [Ancillary Activity: Beyond Core Metabolism in Immune](#)
457 [Cells](#). Cell Metabolism. 2017 Jul;26(1):131–41.
- 458 25. Sun L, Yang X, Yuan Z, Wang H. [Metabolic Reprogramming in Immune Response and](#)
459 [Tissue Inflammation](#). Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2020 Sep;40(9):1990–
460 2001.
- 461 26. Franceschi C, Garagnani P, Vitale G, Capri M, Salvioli S. [Inflammaging and “Garb-aging”](#).
462 Trends in Endocrinology & Metabolism. 2017 Mar;28(3):199–212.

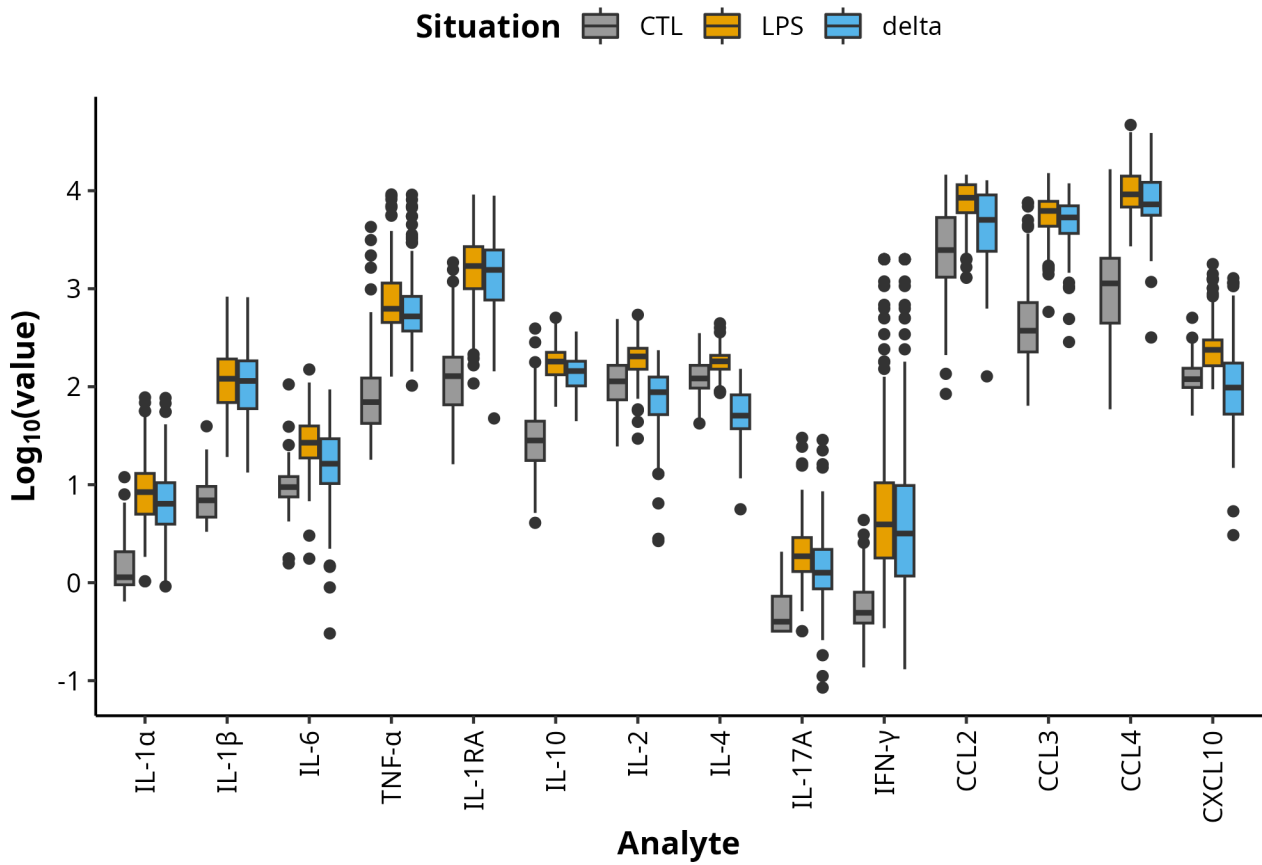
- 463 27. Peters MJ, Joehanes R, Pilling LC, Schurmann C, Conneely KN, Powell J, et al. [The](#)
464 [transcriptional landscape of age in human peripheral blood](#). Nature Communications. 2015
465 Oct;6(1):8570.
- 466 28. Bjornsson HT. [Intra-individual Change Over Time in DNA Methylation With Familial](#)
467 [Clustering](#). JAMA. 2008 Jun;299(24):2877.
- 468 29. Mehrzad J, Zhao X. [T lymphocyte proliferative capacity and CD4⁺/CD8⁺ ratio in](#)
469 [primiparous and pluriparous lactating cows](#). Journal of Dairy Research. 2008 Nov;75(4):457–65.
- 470 30. Gowers IR, Walters K, Kiss-Toth E, Read RC, Duff GW, Wilson AG. [Age-related loss of](#)
471 [CpG methylation in the tumour necrosis factor promoter](#). Cytokine. 2011 Dec;56(3):792–7.
- 472 31. Ferreira AV, Domiguéz-Andrés J, Netea MG. [The Role of Cell Metabolism in Innate Immune](#)
473 [Memory](#). Journal of Innate Immunity. 2022;14(1):42–50.
- 474 32. Sherwood ER, Burelbach KR, McBride MA, Stothers CL, Owen AM, Hernandez A, et al.
475 [Innate Immune Memory and the Host Response to Infection](#). The Journal of Immunology. 2022
476 Feb;208(4):785–92.
- 477 33. Cheng Z, Ferris C, Crowe MA, Ingvarsten KL, Grelet C, Vanlierde A, et al. [Hepatic Global](#)
478 [Transcriptomic Profiles of Holstein Cows According to Parity Reveal Age-Related Changes in](#)
479 [Early Lactation](#). International Journal of Molecular Sciences. 2023 Jun;24(12):9906.
- 480 34. Saco Y, Bassols A. [Acute phase proteins in cattle and swine: A review](#). Veterinary Clinical
481 Pathology. 2023 Feb;52(S1):50–63.
- 482 35. Gavazzi G, Krause KH. [Ageing and infection](#). The Lancet Infectious Diseases. 2002
483 Nov;2(11):659–66.
- 484 36. Wojdak-Maksymiec K, Szyda J, Strabel T. [Parity-dependent association between TNF- \$\alpha\$ and](#)
485 [LTF gene polymorphisms and clinical mastitis in dairy cattle](#). BMC Veterinary Research.
486 2013;9(1):114.

- 487 37. Reichel CA, Rehberg M, Lerchenberger M, Berberich N, Bihari P, Khandoga AG, et al. [Ccl2](#)
488 [and Ccl3 mediate neutrophil recruitment via induction of protein synthesis and generation of lipid](#)
489 [mediators](#). Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2009 Nov;29(11):1787–93.
- 490 38. Glass WG, Liu MT, Kuziel WA, Lane TE. [Reduced macrophage infiltration and](#)
491 [demyelination in mice lacking the chemokine receptor CCR5 following infection with a neurotropic](#)
492 [coronavirus](#). Virology. 2001 Sep;288(1):8–17.
- 493 39. Trifilo MJ, Bergmann CC, Kuziel WA, Lane TE. [CC chemokine ligand 3 \(CCL3\) regulates](#)
494 [CD8\(+\)-T-cell effector function and migration following viral infection](#). Journal of Virology. 2003
495 Apr;77(7):4004–14.
- 496 40. Halasa T, Kirkeby C. [Differential Somatic Cell Count: Value for Udder Health Management](#).
497 Frontiers in Veterinary Science. 2020 Dec;7:609055.
- 498 41. Filipe J, Inglesi A, Amadori M, Guarneri F, Menchetti L, Curone G, et al. [Preliminary](#)
499 [Evidence of Endotoxin Tolerance in Dairy Cows during the Transition Period](#). Genes. 2021
500 Nov;12(11):1801.
- 501 42. Sullivan T, Sharma A, Lamers K, Mallard BA, Cánovas A, Karrow NA. [Immunotolerance of](#)
502 [dairy heifers in response to repeated exposure to bacterial lipopolysaccharide endotoxin](#). Veterinary
503 Immunology and Immunopathology. 2023 May;259:110579.
- 504 43. Crookenden MA, Moyes KM, Kuhn-Sherlock B, Lehnert K, Walker CG, Looor JJ, et al.
505 [Transcriptomic analysis of circulating neutrophils in metabolically stressed peripartal grazing dairy](#)
506 [cows](#). Journal of Dairy Science. 2019 Aug;102(8):7408–20.
- 507 44. Kim ET, Joo SS, Kim DH, Gu BH, Park DS, Atikur RM, et al. [Common and Differential](#)
508 [Dynamics of the Function of Peripheral Blood Mononuclear Cells between Holstein and Jersey](#)
509 [Cows in Heat-Stress Environment](#). Animals: an open access journal from MDPI. 2020
510 Dec;11(1):19.

- 511 45. Bagath M, Krishnan G, Devaraj C, Rashamol VP, Pragna P, Lees AM, et al. [The impact of](#)
512 [heat stress on the immune system in dairy cattle: A review](#). Research in Veterinary Science. 2019
513 Oct;126:94–102.
- 514 46. Chen S, Wang J, Peng D, Li G, Chen J, Gu X. [Exposure to heat-stress environment affects](#)
515 [the physiology, circulation levels of cytokines, and microbiome in dairy cows](#). Scientific Reports.
516 2018 Oct;8(1):14606.
- 517 47. Dahl GE, Tao S, Laporta J. [Heat Stress Impacts Immune Status in Cows Across the Life](#)
518 [Cycle](#). Frontiers in Veterinary Science. 2020;7:116.
- 519 48. Trevisi E, Minuti A. [Assessment of the innate immune response in the periparturient cow](#).
520 Research in Veterinary Science. 2018 Feb;116:47–54.
- 521 49. Maurić Maljković M, Vlahek I, Piplica A, Ekert Kabalin A, Sušić V, Stevanović V. [Prospects](#)
522 [of toll-like receptors in dairy cattle breeding](#). Animal Genetics. 2023 Aug;54(4):425–34.
- 523 50. Bai X, Wang X, Lin T, Dong W, Gao Y, Ji P, et al. [Toll-like Receptor 2 Is Associated with the](#)
524 [Immune Response, Apoptosis, and Angiogenesis in the Mammary Glands of Dairy Cows with](#)
525 [Clinical Mastitis](#). International Journal of Molecular Sciences. 2022 Sep;23(18):10717.
- 526 51. Uffelmann E, Huang QQ, Munung NS, De Vries J, Okada Y, Martin AR, et al. [Genome-wide](#)
527 [association studies](#). Nature Reviews Methods Primers. 2021 Aug;1(1):59.

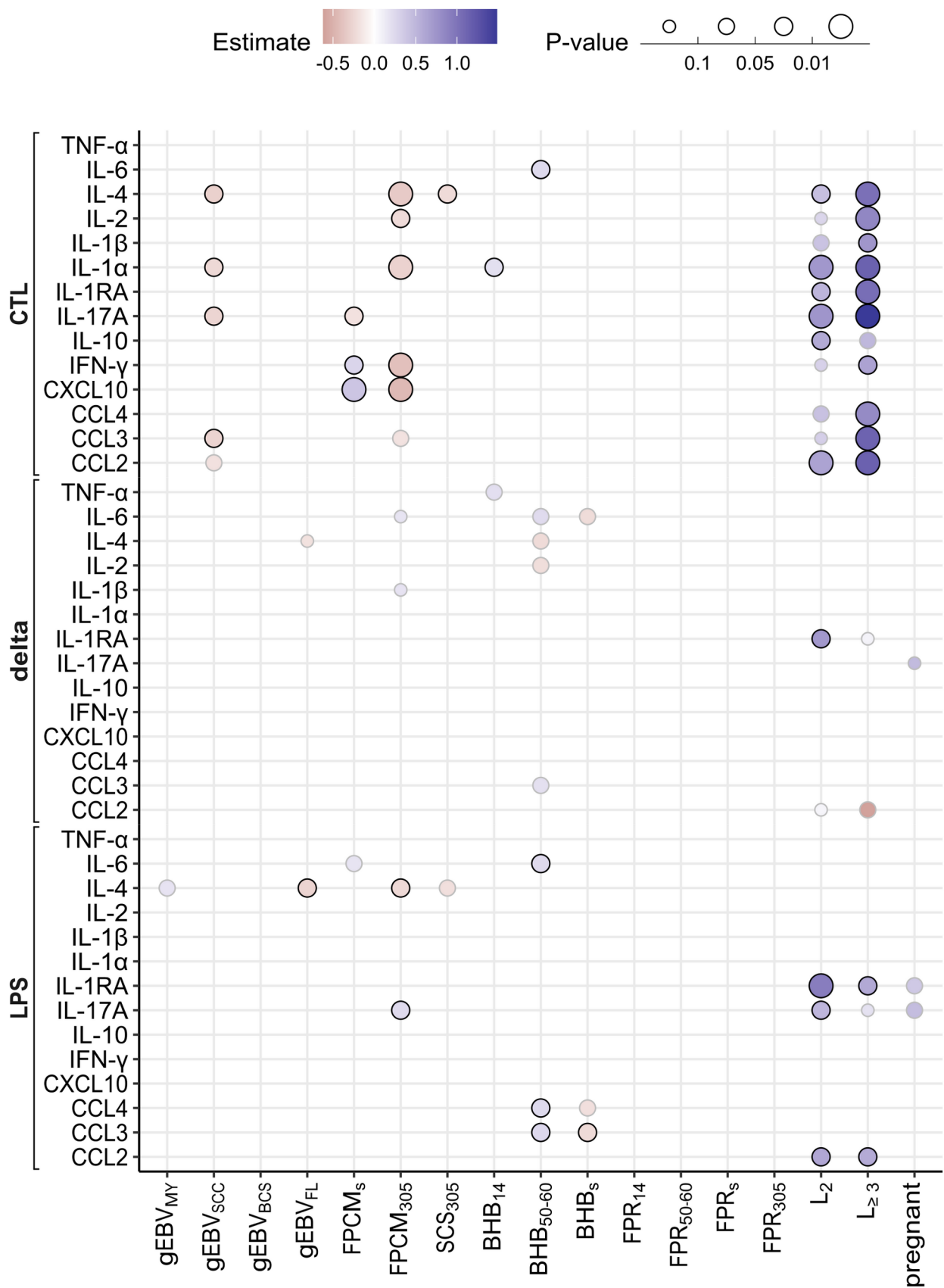
Table 1: Pairwise comparisons between lactation ranks (first, second, and third or higher). The comparisons were performed using a Wilcoxon rank sum test corrected by the Benjamini-Hochberg method. Lactation ranks not sharing the same superscript letter are statistically different (adjusted p value < 0.05).

Lactation rank	1	2	3	mean±sd
Number of cows	42	43	20	-
pregnant	10 ^a	12 ^a	4 ^a	-
SCS ₃₀₅	3.2±1.3 ^a	2.3±1.1 ^b	2.7±1.2 ^{ab}	2.8±1.2
MY ₃₀₅	8186±1559 ^a	8265±1297 ^a	9172±847 ^b	8406±1382
SCS _s	2.4±1.5 ^a	1.2±1.7 ^b	1.2±1.6 ^b	1.7±1.7
MY _s	30.5±6.7 ^a	34.5±5.2 ^b	38.2±4.1 ^c	33.6±6.3
FPCM _s	29.5±6.2 ^a	31.3±4.4 ^a	32.7±4.5 ^a	30.8±5.3
BHB _s	0.036±0.028 ^a	0.026±0.023 ^{ab}	0.018±0.03 ^b	0.028±0.027
FPR _s	1.2±0.2 ^a	1±0.1 ^b	1±0.2 ^b	1.1±0.2
BHB ₁₄	0.074±0.056 ^a	0.07±0.048 ^a	0.051±0.039 ^a	0.068±0.05
FPR ₁₄	1.3±0.2 ^a	1.2±0.1 ^a	1.2±0.1 ^a	1.2±0.2
FPCM ₃₀₅	7678±1400 ^a	7544±1123 ^a	8117±861 ^a	7707±1209
BHB ₃₀₅	0.048±0.018 ^a	0.056±0.022 ^a	0.045±0.025 ^a	0.05±0.021
FPR ₃₀₅	1.2±0.1 ^a	1.2±0.1 ^a	1.3±0.1 ^a	1.2±0.1
BHB ₅₀₋₆₀	0.028±0.025 ^a	0.05±0.034 ^b	0.039±0.035 ^{ab}	0.039±0.032
FPR ₅₀₋₆₀	1.2±0.2 ^a	1.2±0.1 ^a	1.3±0.2 ^a	1.2±0.1
gEBV _{MY}	208.2±509.2 ^a	281.1±364.8 ^a	372.4±452.4 ^a	269.3±443.8
gEBV _{SCC}	-0.3±1.1 ^a	0.2±1.1 ^b	0.6±0.8 ^b	0.1±1.1
gEBV _{BCS}	-0.1±0.5 ^a	0.4±0.9 ^b	0±0.8 ^{ab}	0.1±0.7
gEBV _{FL}	0.2±0.7 ^a	0.3±0.6 ^a	0.6±0.5 ^a	0.3±0.6



529

Figure 1: Boxplot of \log_{10} -transformed cytokine concentrations in pg.mL^{-1} without stimulation (CTL) and with LPS stimulation. The delta situation represents the \log_{10} -transformed concentration differences between both previous situation (LPS - CTL)

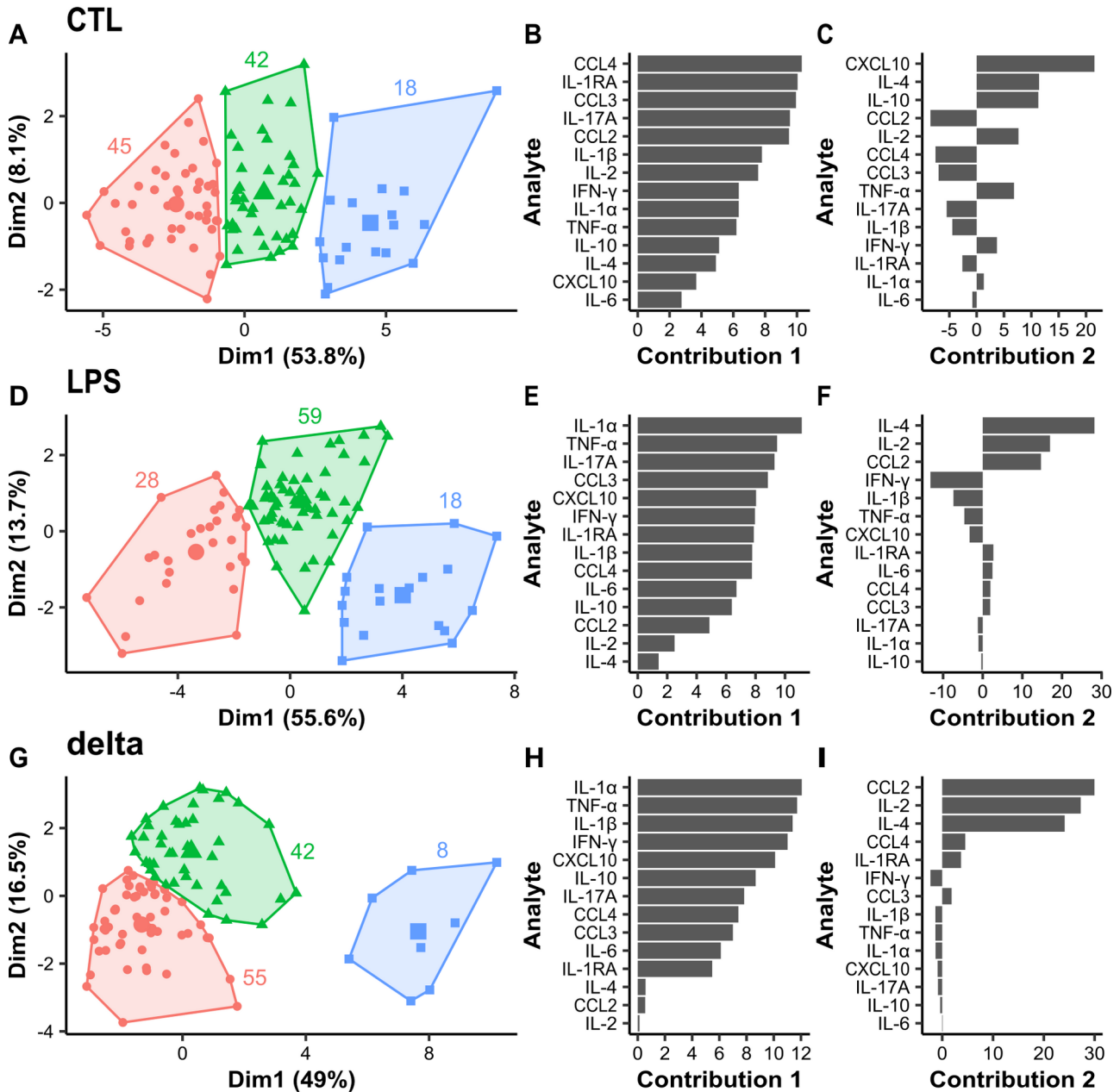


530

Figure 2: Summary of linear regressions results after a variable selection with a backward stepwise algorithm and using the likelihood ratio test to retain the best model. X and y-axis represent

respectively the independent variables (production and functional traits) and the analytes for a given situation (CTL, LPS or delta values). Size and color of a dot correspond respectively to the p-value and the estimate of the regression parameter. Independent variables with adjusted p value < 0.05 are circled in black.

cluster ● 1 ▲ 2 ■ 3



531

Figure 3: HCPC carried on cytokine concentrations obtained for CTL (A-C), LPS (D-F) situations and delta values (G-I). On the plot of the individuals (A, D and G), each dot represents a cow and its color and shapes correspond to the cluster it belongs to. Colored numbers indicate the number

of cows in each cluster. The x and y-axis correspond to the PCA principal components. The proportion of variance explained by each principal components is shown in brackets. The contribution of the cytokines to the first (B, E and H) and second (C, F and I) principal components are represented by a horizontal barplot.

532

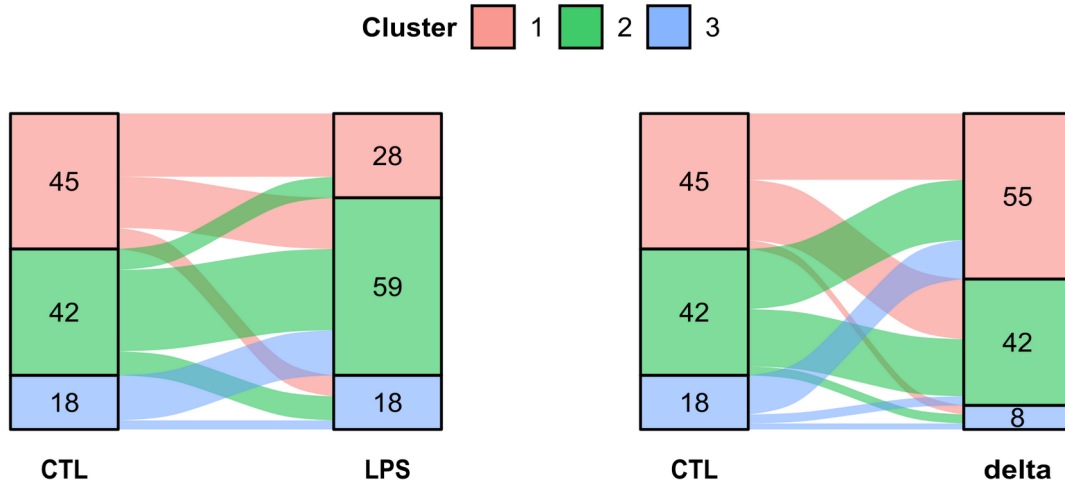
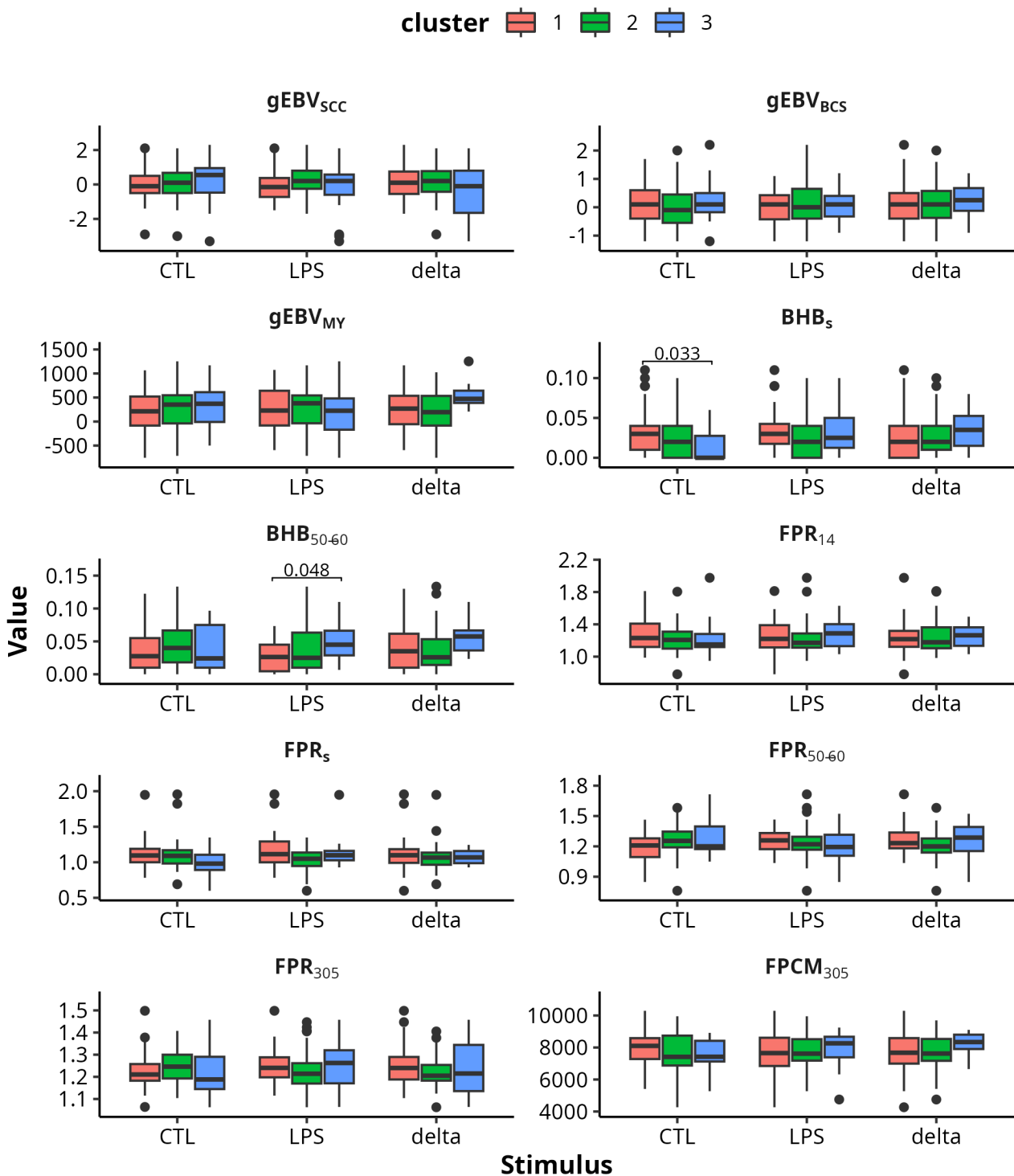


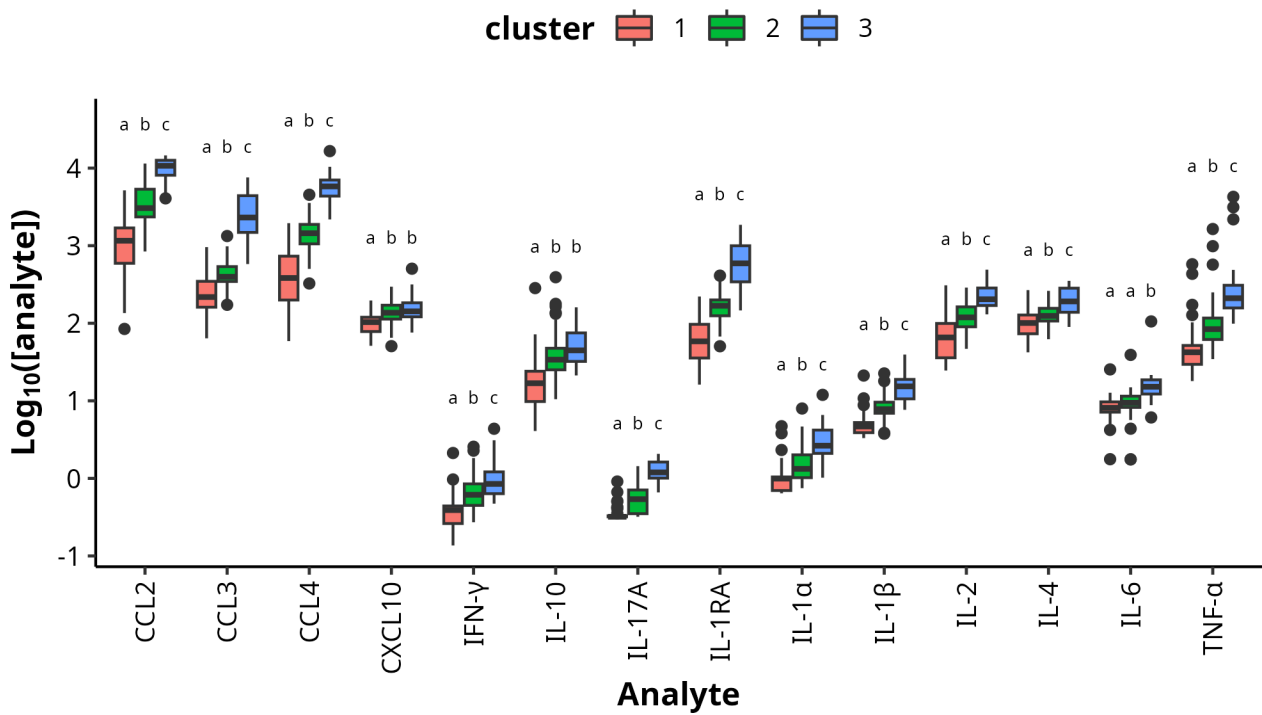
Figure 4: Alluvial plot comparing HCPC clustering between CTL, LPS and delta. For a given line, the thickness is proportional to the number of individuals from the left cluster (before stimulation) going to the right cluster (after stimulation). The numbers represent the size of the clusters.



533

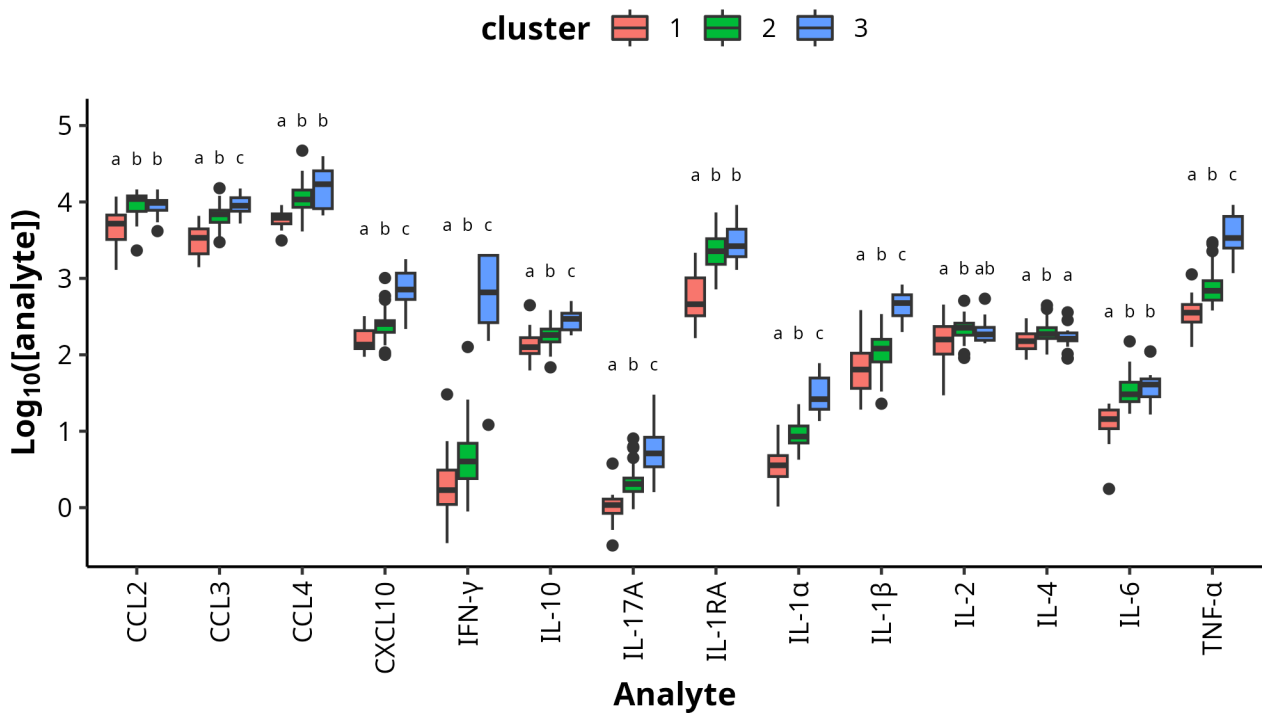
Figure 5: Boxplots of estimated breeding values for milk yield (INLAIT), somatic cell score (INCELL), body condition score (INECPH), β -hydroxybutyrate concentrations in milk at the sampling date, at the peak milk yield, and fat- and protein-corrected milk on the 305 days in milk. The box colors correspond to the cluster determined by the HCPC for CTL, LPS and delta situations. Pairwise Wilcoxon rank sum tests were performed to compare clusters in each situation.

Only significant comparisons are shown in the figure (bracket topped with the corresponding p-value). P-values were corrected using the Benjamin-Hochberg method for multiple comparisons.



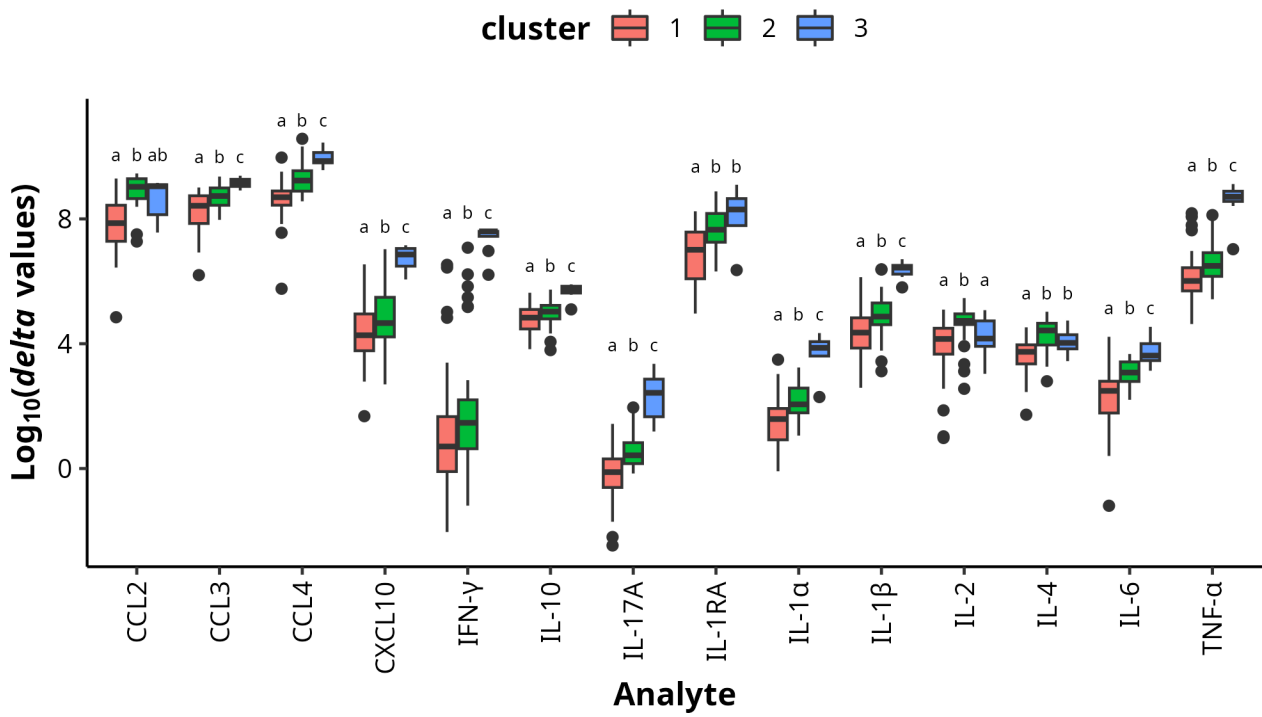
534

Figure S1: Boxplot of log₁₀-transformed cytokine concentrations in pg.mL⁻¹ for each cluster in the absence of stimulation. For each cytokine, pairwise comparisons between clusters were performed using a Wilcoxon rank sum test corrected by the Benjamini-Hochberg method. Clusters not sharing the same superscript letter are significantly different.



535

Figure S2: Boxplot of log₁₀-transformed cytokine concentrations in pg.mL⁻¹ for each cluster in the LPS situation. For each cytokine, pairwise comparisons between clusters were performed using a Wilcoxon rank sum test corrected by the Benjamini-Hochberg method. Clusters not sharing the same superscript letter are significantly different.



536

Figure S3: Boxplot of log₁₀-transformed delta values for each cluster. For each cytokine, pairwise comparisons between clusters were performed using a Wilcoxon rank sum test corrected by the Benjamini-Hochberg method. Clusters not sharing the same superscript letter are significantly different.

2.4.2 Extension aux autres *stimuli*

L'étude précédente a permis d'identifier des *clusters* de vaches présentant des profils cytokiniques en l'absence de stimulation ou en réponse au LPS en lien avec certains index génétiques, caractères de production et fonctionnels. La même démarche a été appliquée à l'ensemble des *stimuli*. Cette partie propose une synthèse des résultats obtenus.

2.4.2.1. Résultats et discussion

Modèles de régression linéaire

Les tableaux 2.2 et 2.3 font la synthèse des variables explicatives retenues dans les modèles de régression linéaire conduits sur les concentrations absolues et la variation de la concentration (*delta*) des cytokines, respectivement. Les résultats détaillés sont disponibles dans l'Annexe D. Les associations entre les concentrations des cytokines et les variables explicatives fluctuent d'un *stimulus* à l'autre. Cependant, certaines associations présentent une redondance.

Le rang de parité est lié positivement aux concentrations d'IL-4 en réponse aux *stimuli* bactériens. Cette observation est cohérente avec l'effet de l'âge sur la polarisation de la réponse immunitaire telle que décrite chez l'homme (358). En effet, la proportion de LTH2 (cellules sécrétant de l'IL-4) dans les populations de LT4 augmente au dépend des LTH1. De même, chez la souris, l'âge est associé à une diminution et une augmentation des sécrétions d'IL-2 (359) et d'IL-4 (360,361), respectivement. Ainsi, la réponse immunitaire tend, avec l'âge, vers une réponse de type 2. Ce constat a également été fait chez des génisses Prim'Holstein avec la méthode HIR (342).

Contrairement au rang de parité, la gravidité est associée à une baisse des concentrations d'IL-4 au moins en réponse à HKEC et HKSU. Ce résultat peut paraître étonnant car, au moins chez l'homme (362), la souris (363) et les bovins (364), le début de la gestation est associé à une hausse de la réponse immunitaire de type 2, caractérisée notamment par des concentrations élevées d'IL-4. Cependant, il faut souligner que cette association entre gestation et réponse immunitaire de type 2 a

été observée en l'absence de stimulation, ce qui peut expliquer la divergence de nos résultats.

Pour l'ensemble des *stimuli*, l'INCELL est associé négativement aux sécrétions des cytokines. En particulier, cette association est observée pour les concentrations d'IL-1 β et d'IL-4 en réponse à HKEC et HKSA. Une étude s'intéressant à la réponse immunitaire après une injection intramammaire de LPS a montré que les vaches résistantes présentaient une réponse inflammatoire limitée par rapport aux vaches plus sensibles (365). En particulier, cette réponse inflammatoire de moindre intensité était caractérisée par une diminution d'IL-1 β . De plus, les cytokines de la famille des IL-1 sont connues pour favoriser le recrutement des GNN (366). Ces éléments suggèrent que les vaches résistantes aux mammites sont capables de mieux contrôler leur réponse inflammatoire.

En réponse à HKEC et HKSU, l'INLAIT est associé à une augmentation des concentrations de quelques cytokines telles que l'IL-2, connue pour polariser la réponse immunitaire vers une réponse de type 1. Une corrélation entre la production laitière et la réponse immunitaire à médiation cellulaire, généralement associée à une réponse de type 1, a déjà été démontrée auparavant (51).

Le FPCM sur les 305 premiers jours de lactation est associé négativement à la sécrétion d'IL-4 pour les trois *stimuli* bactériens. *E. coli*, *S. aureus* et *S. uberis* sont connus pour induire une réponse immunitaire de type 3 (367). Les principaux effecteurs de cette réponse sont les GNN (367). La migration et l'activité de ces derniers est inhibée par l'IL-4 (368). Une diminution de la concentration de cette cytokine semble donc nécessaire pour permettre une réponse immunitaire de type 3 efficace. Ainsi, les vaches ayant un FPCM₃₀₅ élevé seraient celles qui parviendraient à polariser correctement leur réponse immunitaire vers le type idoine. Par ailleurs, pour HKSU, l'orientation vers une réponse immunitaire de type 3 est davantage marquée par, en plus d'une diminution d'IL-4, une hausse d'IL-17A et de CCL2 (chimio-attraction des monocytes). Une hausse de CCL2 induite par IL-17A a déjà été décrite dans des études antérieures (369,370).

SCS₃₀₅ est lié négativement à la sécrétion d'IL-4 lors d'une exposition à HKEC et HKSA. Comme mentionné précédemment, cette diminution de sécrétion peut être un moyen de recruter et d'activer les GNN (368).

Les vaches ayant des concentrations de BHB élevées autour du pic de lactation sécrètent plus de CCL4 et d'IL-6. Une hausse de la concentration plasmatique d'AGNE, généralement corrélée à celle du BHB (371), entraîne une augmentation de l'expression des TLR2 et 4 (372). Ainsi, il n'est pas étonnant d'observer une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, en réponse aux *stimuli* bactériens.

Les sécrétions d'IL-17A et IL-1RA augmentent avec le rang de lactation pour l'ensemble des ligands TLR. Une hausse d'IL-17A en réponse au LPS et à FSL-1 était attendue car ces ligands sont généralement associés à des bactéries extracellulaires. En revanche, pour GDQ, une hausse des cytokines polarisant la réponse immunitaire vers le type 1 aurait été plus compréhensible. Une hausse de sécrétion de CCL2 est également observée pour le LPS et FSL-1. Par ailleurs, le rang de parité est associé à une augmentation de la concentration de la majorité des cytokines dans le cas de GDQ. Ces éléments confirment le phénomène d'immunosénescence chez la vache laitière.

La gravidité semble être associée à une augmentation des concentrations d'IL-1RA dans le cas d'une stimulation par le LPS ou FSL-1. En revanche, elle est associée à une augmentation des concentrations des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , IL-1 α et IL-1 β) et polarisant la réponse immunitaire vers le type 1 (IFN- γ) lors d'une stimulation par GDQ. Le début de la gestation est caractérisé par une diminution de la réponse de type 1 au profit de la réponse de type 2 (364). Une réponse de type 1 trop élevée peut même conduire à un avortement (373,374). Ainsi, bien qu'une augmentation de l'intensité de la réponse de type 1 face à GDQ puisse paraître contre-intuitive, il pourrait s'agir d'un mécanisme de défense inné lié à la gestation.

Comme pour les *stimuli* bactériens, l'INCELL est corrélé négativement aux concentrations des cytokines pour lesquelles cette variable a été retenue (CXCL10 et IFN- γ pour FSL-1, et IFN- γ , IL-17A et TNF- α pour GDQ).

Les sécrétions d'IL-4 semblent augmenter avec l'INLAIT en réponse au LPS et à GDQ. Les vaches ayant un haut potentiel laitier ont donc une réponse immunitaire de type 2 en réponse au LPS. Concernant GDQ, cette polarisation est moins franche compte tenu d'une hausse de la sécrétion d'IL-2, cytokine impliquée dans la réponse de type 1. Un effet du potentiel génétique laitier sur la réponse immunitaire innée a déjà été décrit dans une étude précédente utilisant une méthode similaire à la nôtre (375). Cette étude s'est intéressée à la sécrétion d'IL-1 β en réponse à une stimulation *ex vivo* sur sang entier avec du LPS, de l'acide lipotéichoïque (reconnu par le TLR2, à l'instar de FSL-1) et des bactéries Gram négatives (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*) et Gram positives (*S. aureus*, *S. dysgalactiae* et *S. uberis*) tuées par la chaleur. La stimulation *ex vivo* a permis de mettre en évidence une sécrétion plus grande d'IL-1 β en réponse au LPS, à l'acide lipotéichoïque et aux bactéries Gram négatives chez les vaches à faible potentiel laitier, une forte corrélation entre les réponses aux bactéries Gram négatives et l'acide lipotéichoïque, une forte corrélation entre les bactéries Gram positives chez les vaches à haut potentiel mais seulement entre *S. aureus* et *S. dysgalactiae* chez les vaches à faible potentiel, et, enfin, une forte corrélation entre *S. uberis* et *E. coli*. Nos analyses n'ont pas mis en évidence de tels effets du potentiel laitier sur la réponse immunitaire innée mais plutôt sur la réponse immunitaire adaptative.

Contrairement à l'INLAIT, l'INLGFO est associé à une diminution des concentrations d'IL-4 pour FSL-1 et GDQ. La polarisation de la réponse immunitaire semble donc jouer un rôle dans la longévité des vaches laitières.

Encore une fois, les concentrations d'IL-4 sont associées négativement au FPCM₃₀₅ pour les trois ligands TLR.

Étonnamment, le FPCM_s est associé à une hausse des concentrations d'IL-6 pour les trois ligands TLR. GDQ se distingue des deux autres ligands des TLR par une hausse de CCL2 et d'IL-10. Ces effets différents de ceux observés pour le FPCM₃₀₅ sont potentiellement la conséquence de profils de production différents avec, d'un côté, des vaches qui présentent un FPCM élevé au moment du prélèvement mais persistant peu et, de l'autre côté, des vaches présentant un FPCM_s modéré et une bonne persistance. Ainsi, les vaches avec une bonne persistance du FPCM module-

raient correctement leur réponse immunitaire contrairement aux vaches avec une persistance limitée.

Les vaches ayant un SCS moyen élevé sur leur lactation 305 jours sécrètent moins d'IL-4 en réponse au LPS et à GDQ. Selon une étude, les vaches souffrant d'une mammites clinique ont une expression plus faible des gènes associés à l'IL-4 par rapport aux vaches saines (376). De plus, comme mentionné précédemment, l'IL-4 inhibe le recrutement et l'activation des GNN (368), cellules somatiques majeures. Un défaut de polarisation Th2 pourrait donc être à l'origine de SCS élevés.

Parmi les ligands TLR, les concentrations de BHB₅₀₋₆₀ sont associées à la hausse de nombreuses cytokines, en particulier CCL3, CCL4 et IL-6. Ce rôle pro-inflammatoire du BHB a déjà été décrit par ailleurs (274).

Enfin, les concentrations de BHB à l'échantillonnage ont un effet négatif sur la sécrétion de CCL3 et CCL4 pour le LPS et FSL-1. De même, son effet est négatif sur la sécrétion d'IL-6 en réponse à GDQ. Les différences d'effet observées entre les concentrations de BHB_s et de BHB₅₀₋₆₀ suggèrent que les vaches ayant des concentrations de BHB₅₀₋₆₀ élevées tendent à avoir une réponse pro-inflammatoire exacerbée mais, si la concentration de BHB se maintient à un niveau élevé jusqu'au prélèvement, son effet pro-inflammatoire diminue. Cette évolution de l'effet du BHB pourrait s'expliquer par une forme d'épuisement cellulaire.

Le rang de parité est lié à une diminution des *delta* de CCL2 pour l'ensemble des *stimuli*. Cette diminution est la résultante de l'association positive entre le rang de parité et les concentrations de CCL2 en absence de stimulation. En effet, comme vu précédemment, les leucocytes tendent à répondre à un *stimulus* par une sécrétion maximale de chimiokines. Ainsi, si la concentration basale des chimiokines augmente avec le rang de parité, le *delta* des chimiokines évolue selon une relation inverse.

L'INCELL est corrélé négativement au *delta* d'IL-1 α et IL-1 β en réponse à HKSA. Ceci est cohérent avec l'association entre les concentrations brutes et l'INCELL, observée en amont.

L'INLAIT est associé à une augmentation des *delta* de TNF- α et d'IL-1RA pour les *stimuli* bactériens. Comme pour l'INCELL, ce résultat est cohérent avec celui obtenu pour les concentrations brutes.

Les vaches ayant un FPCM₃₀₅ élevé sont capables d'augmenter très fortement leur sécrétion de CCL2 par rapport à son niveau basal. Ce point est intéressant car les résultats des modèles de régression linéaire ne permettaient pas de l'anticiper. Le FPCM₃₀₅ serait donc lié au recrutement des monocytes (377). Par ailleurs, le FPCM₃₀₅ est associé positivement aux sécrétions de nombreuses cytokines dans la situation HKSU, en particulier IL-17A. Une bonne capacité de production dépendrait donc de la capacité à orienter la réponse immunitaire vers une réponse de type 3.

Les vaches ayant un FPCM_s élevé tendent à sécréter proportionnellement plus d'IL-10. Les vaches capables de produire beaucoup à un instant donné seraient donc les plus aptes à contrôler leur réponse inflammatoire en réponse à un agent pathogène.

En présence d'HKEC et d'HKSA, le *delta* de CCL4 tend à augmenter avec les concentrations de BHB₅₀₋₆₀. Ce résultat est cohérent avec l'association positive observée entre les concentrations de BHB₅₀₋₆₀ et les sécrétions de CCL4 en réponse à ces *stimuli*. Le BHB est connu pour inhiber l'activité des macrophages (378). Une augmentation du *delta* de CCL4 avec les concentrations de BHB₅₀₋₆₀ est possiblement un mécanisme destiné à compenser l'effet inhibiteur du BHB sur les macrophages. De plus, une augmentation du *delta* de CCL4 en réponse à HKEC et HKSA confirme une implication des macrophages dans l'élimination de ces agents de mammite (379,380).

Concernant les ligands des TLR, comme pour les *stimuli* bactériens, le *delta* de CCL2 augmente avec le rang de parité. En revanche, en réponse à GDQ, ce dernier est associé à une augmentation des *delta* de nombreuses autres cytokines impliquées dans la réponse immunitaire innée (IL-1 α et IL-1 β), la réponse de type 1 (IFN- γ) et le contrôle de la réponse immunitaire (IL-10). Ces éléments sont en accord avec le phénomène d'immunosénescence déjà rapporté.

L'INCELL est associé à une diminution du *delta* d'IL-17A en réponse à FSL-1 et GDQ. Cette diminution, également observée en présence mais aussi en absence de *stimulus*, témoigne d'un contrôle très marqué de la réponse de type 3 chez les vaches ayant un INCELL élevé.

Les vaches ayant un INLGFO élevé sont caractérisées par un *delta* d'IL-4 plus faible en réponse aux trois ligands des TLR, en lien avec les concentrations absolues observées sous stimulation.

Le FPCM₃₀₅ est associé à une augmentation du *delta* d'IL-6 en présence de LPS et GDQ. Cette association n'était pas prévisible au regard des concentrations observées en absence et en présence de ces deux *stimuli*. Ceci suggère une capacité de modulation de la sécrétion d'IL-6 augmentant avec le FPCM₃₀₅.

Les concentrations de BHB₅₀₋₆₀ sont corrélées positivement aux *delta* de CCL3 et IL-6 pour le LPS et FSL-1. Les concentrations d'IL-6 étant également croissantes avec les concentrations de BHB₅₀₋₆₀, cette relation suggère que les concentrations de BHB autour du pic de lactation potentialisent à distance la sécrétion d'IL-6 ou affectent les mécanismes de contrôle après activation des TLR2 et 4. Par ailleurs, les concentrations de BHB₅₀₋₆₀ sont aussi associées négativement au *delta* d'IL-4 en réponse au LPS et à GDQ. Cette association n'aurait pu être déduite des concentrations absolues et évoque une diminution de l'intensité de la réponse de type 2 et, potentiellement, un recrutement et une activation plus importante des GNN en réponse à ces deux ligands.

Enfin, les concentrations de BHB au moment du prélèvement sont associées à une diminution du *delta* d'IL-6 en réponse au LPS et à GDQ, et à une augmentation d'IL-1 β en réponse à FSL-1. Dans le cas du LPS, l'association entre le BHB_s et la sécrétion d'IL-6 est opposée à celle observée pour le BHB₅₀₋₆₀, signe d'un potentiel épuisement cellulaire lorsque la concentration de BHB reste élevée sur une longue durée.

TABLEAU 2.2. : Synthèse des résultats des régressions linéaires conduites sur les concentrations des cytokines.

Variable	CTL	HKEC	HKSA	HKSU	LPS	FSL	GDQ
parité	↑CCL2 (p<5.10 ⁻³)	↑IL-10 (p=0.07)	↑IL-17A (p=0.06)	↑IL-4 (p=0.04)	↑CCL2 (p=0.02)	↑CCL2 (p=0.01)	↑CCL3 (p=0.03)
	↑CCL3 (p<5.10 ⁻³)	↑IL-4 (p=0.01)	↑IL-4 (p=0.06)		↑IL-17A (p=0.03)	↑IL-17A (p=0.01)	↑CXCL10 (p<5.10 ⁻³)
	↑CCL4 (p=0.01)		↓TNF-α (p=0.2)		↑IL-1RA (p<5.10 ⁻³)	↑IL-1RA (p=0.01)	↑IFN-γ (p<5.10 ⁻³)
	↑IFN-γ (p=0.02)						↑IL-10 (p=0.03)
	↑IL-10 (p=0.01)						↑IL-17A (p<5.10 ⁻³)
	↑IL-17A (p<5.10 ⁻³)						↑IL-1RA (p<5.10 ⁻³)
	↑IL-1RA (p<5.10 ⁻³)						↑IL-1α (p<5.10 ⁻³)
	↑IL-1α (p<5.10 ⁻³)						↑IL-1β (p<5.10 ⁻³)
	↑IL-1β (p=0.01)						↑IL-4 (p=0.02)
	↑IL-2 (p<5.10 ⁻³)						↑TNF-α (p<5.10 ⁻³)
↑IL-4 (p<5.10 ⁻³)							
gravide		↓IL-2 (p=0.09)		↓IL-4 (p=0.09)	↑IL-17A (p=0.06)	↑IL-1RA (p=0.04)	↑IFN-γ (p=0.01)
		↓IL-4 (p=0.09)			↑IL-1RA (p=0.08)		↑IL-1α (p=0.01)
							↑IL-1β (p=0.02)
INCELL	↓CCL2 (p=0.05)	↓IL-1β (p=0.07)	↓IL-1α (p=0.06)			↓CXCL10 (p=0.07)	↓IFN-γ (p=0.02)
	↓CCL3 (p=0.01)	↓IL-4 (p=0.04)	↓IL-1β (p=0.06)			↓IFN-γ (p=0.08)	↓IL-17A (p=0.06)
	↓IL-17A (p=0.01)		↓IL-4 (p=0.06)				↓TNF-α (p=0.04)
	↓IL-1α (p=0.01)		↓TNF-α (p=0.06)				
	↓IL-4 (p=0.01)						
INECPH						↑TNF-α (p=0.02)	

Variable	CTL	HKEC	HKSA	HKSU	LPS	FSL	GDQ
INLAIT		↑IL-17A (p=0.07)		↑IL-1RA (p=0.09)	↑IL-4 (p=0.08)		↑IL-2 (p=0.04)
		↑IL-2 (p=0.07)		↑IL-2 (p=0.1)			↑IL-4 (p=0.04)
		↑TNF-α (p=0.07)					↑TNF-α (p=0.04)
INLGFO					↓IL-4 (p=0.03)		↓IL-4 (p<5.10 ⁻³)
FPCM ₃₀₅	↓CCL3 (p=0.05)	↓IL-4 (p=0.01)	↓IL-4 (p=0.06)	↑CCL2 (p=0.09)	↑IL-17A (p=0.03)	↓IL-4 (p=0.05)	↓IL-4 (p=0.01)
	↓CXCL10 (p<5.10 ⁻³)	↑IL-6 (p=0.07)		↑IFN-γ (p=0.09)	↓IL-4 (p=0.03)		
	↓IFN-γ (p<5.10 ⁻³)			↑IL-10 (p=0.09)			
	↓IL-1α (p<5.10 ⁻³)			↑IL-17A (p=0.02)			
	↓IL-2 (p=0.02)			↑IL-1RA (p=0.09)			
FPCM _p	↓IL-4 (p<5.10 ⁻³)			↓IL-4 (p=0.1)			
	↑CXCL10 (p=0.01)	↑CCL2 (p=0.07)	↑CCL2 (p=0.06)		↑IL-6 (p=0.07)	↑IL-6 (p=0.06)	↑CCL2 (p<5.10 ⁻³)
	↑IFN-γ (p=0.03)		↑IFN-γ (p=0.09)				↑IL-10 (p=0.02)
SCS ₃₀₅	↓IL-17A (p=0.04)		↑IL-10 (p=0.06)				↑IL-6 (p=0.01)
	↓IL-4 (p=0.03)	↓CCL4 (p=0.07)	↓IL-4 (p=0.06)		↓IL-4 (p=0.07)		↓IL-4 (p=0.01)
BHB ₁₄		↓IL-4 (p=0.04)					
	↑IL-1α (p=0.03)						

Variable	CTL	HKEC	HKSA	HKSU	LPS	FSL	GDQ
BHB ₅₀₋₆₀	↑IL-6 (p=0.01)	↑CCL4 (p=0.04)	↑CCL4 (p=0.06)		↑CCL3 (p=0.03)	↑CCL3 (p=0.01)	↑IL-6 (p=0.02)
		↑IL-1RA (p=0.09)	↑IL-6 (p=0.06)		↑CCL4 (p=0.03)	↑CCL4 (p=0.01)	
		↑IL-6 (p=0.06)			↑IL-6 (p=0.03)	↑IL-10 (p=0.08)	
						↑IL-1α (p=0.07)	
						↑IL-1β (p=0.06)	
						↑IL-6 (p=0.01)	
						↑TNF-α (p=0.06)	
BHB _p					↓CCL3 (p=0.03)	↓CCL3 (p=0.05)	↓IL-6 (p=0.01)
					↓CCL4 (p=0.07)	↓CCL4 (p=0.06)	

TABLEAU 2.3. : Synthèse des résultats des régressions linéaires conduites sur les delta des cytokines.

Variable	HKEC	HKSA	HKSU	LPS	FSL	GDQ
parité	↓CCL2 (p=0.05)	↓CCL2 (p=0.03)	↓CCL2 (p<5.10 ⁻³)	↓CCL2 (p=0.09)	↓CCL2 (p=0.08)	↓CCL2 (p=0.02)
		↓TNF-α (p=0.03)	↑IL-17A (p=0.06)	↑IL-1RA (p=0.01)	↓IL-4 (p=0.06)	↑CXCL10 (p<5.10 ⁻³)
						↑IFN-γ (p=0.02)
						↑IL-10 (p=0.03)
gravide	↑IL-1RA (p=0.1)			↑IL-17A (p=0.1)	↑CCL3 (p=0.08)	↑IFN-γ (p=0.06)
						↑IL-1RA (p=0.07)
INCELL		↓IL-1α (p=0.06)	↑CCL2 (p=0.1)		↓CXCL10 (p=0.02)	↓IL-17A (p=0.03)
		↓IL-1β (p=0.03)			↓IFN-γ (p=0.01)	
					↓IL-17A (p=0.08)	
					↓IL-1α (p=0.09)	
					↑IL-4 (p=0.08)	
INECPH					↓TNF-α (p=0.08)	
		↑IL-17A (p=0.07)			↑IFN-γ (p=0.08)	↑IL-17A (p=0.03)
						↑IL-4 (p=0.03)
						↑TNF-α (p=0.04)
INLAIT	↑TNF-α (p=0.1)	↑IL-1RA (p=0.11)	↑IL-1RA (p=0.08)		↑CXCL10 (p=0.08)	↑IL-17A (p=0.07)
		↑TNF-α (p=0.1)			↑IFN-γ (p=0.08)	↑IL-1RA (p=0.03)
						↑IL-4 (p=0.06)
						↑IL-6 (p=0.06)

Variable	HKEC	HKSA	HKSU	LPS	FSL	GDQ
INLGFO	↓CCL4 (p=0.11)			↓IL-4 (p=0.1)	↓IL-4 (p=0.08)	↓IL-4 (p=0.05)
FPCM ₃₀₅	↑CCL2 (p=0.1) ↑IL-6 (p=0.1)	↑CCL2 (p=0.03) ↑IL-4 (p=0.09)	↑CCL2 (p=0.02) ↑IFN-γ (p=0.08) ↑IL-17A (p=0.02) ↑IL-1RA (p=0.06) ↑IL-4 (p=0.07) ↑IL-6 (p=0.08)	↑IL-1β (p=0.1) ↑IL-6 (p=0.1)		↑IL-10 (p=0.05) ↑IL-6 (p=0.05)
FPCM _p		↑IL-10 (p=0.03)	↑IL-10 (p=0.02)		↑IL-4 (p=0.08)	↑CCL2 (p=0.04)
SCS ₃₀₅	↓CCL4 (p=0.04) ↓IL-10 (p=0.1)					
BHB ₁₄				↑TNF-α (p=0.09)		↓IL-1α (p=0.06)
BHB ₅₀₋₆₀	↑CCL4 (p=0.04) ↑IL-1RA (p=0.1) ↑IL-1α (p=0.1) ↑IL-6 (p=0.1)	↑CCL4 (p=0.04)		↑CCL3 (p=0.09) ↓IL-2 (p=0.09) ↓IL-4 (p=0.09) ↑IL-6 (p=0.09)	↑CCL3 (p=0.06) ↑CCL4 (p=0.08) ↑IL-1RA (p=0.08) ↑IL-6 (p=0.08)	↓IL-4 (p=0.02)
BHB _p	↓IL-1α (p=0.1)	↑CCL2 (p=0.09)		↓IL-6 (p=0.09)	↑IL-1β (p=0.08)	↓IL-6 (p=0.02)

HCPC

Les HCPC ont été réalisées sur les concentrations absolues mais aussi sur les valeurs *delta* des cytokines pour chacune des situations. Le nombre de composantes principales retenu a été limité à deux et le nombre de *clusters* a été choisi de façon à maximiser la perte d'inertie relative tout en conservant des *clusters* ayant un effectif minimal de 5 individus. Les cercles des corrélations associés sont disponibles en [Annexe E](#). Pour l'ensemble des situations, ces critères ont permis de mettre en évidence 3 *clusters* ([Figures 2.2 à 2.5](#)).

Dans la plupart des situations, les *clusters* étaient disposés le long de la première composante principale, sauf pour les classifications conduites sur les valeurs *delta*. En effet, dans le cas des valeurs *delta* obtenues en réponse aux bactéries ([Figure 2.4](#)), la première composante principale permettait de distinguer le *cluster* 1 des deux autres tandis que la seconde composante principale séparait les *clusters* 2 et 3. Concernant la classification conduite sur les valeurs *delta* en réponse au LPS ([Figure 2.5](#)), la première composante principale permettait de distinguer le *cluster* 3 des deux autres tandis que la seconde séparait les *clusters* 1 et 2. Pour ce qui est des valeurs *delta* en réponse à FSL-1 ([Figure 2.5](#)), les *clusters* étaient globalement disposés le long de la première composante principale avec, en plus, une séparation des deux premiers *clusters* et du troisième selon la seconde composante. En réponse à GDQ, les *clusters* obtenus sur les valeurs *delta* ([Figure 2.5](#)) étaient disposés le long de la première composante principale.

Pour les *stimuli* bactériens ([Figure 2.2](#)), les variables dont la contribution relative à la première composante principale dépassait la contribution moyenne relative étaient IL-1 α , IFN- γ , CCL2 et IL-1RA tandis que IL-2 et IL-4 étaient celles qui présentaient la plus faible contribution relative. Ainsi, les *clusters* se distinguaient les uns des autres par l'intensité de leur réponse immunitaire innée, son contrôle et le niveau d'activation des macrophages, ces différents éléments étant croissants du *cluster* 1 au 3.

Pour les ligands des TLR ([Figure 2.3](#)), la première composante principale était globalement influencée par IL-1 α , IL-1RA, TNF- α , IL-17A, CCL3 et IL-1 β . Comme pour les *stimuli* bactériens, IL-2 et IL-4 étaient les cytokines les moins bien projetées

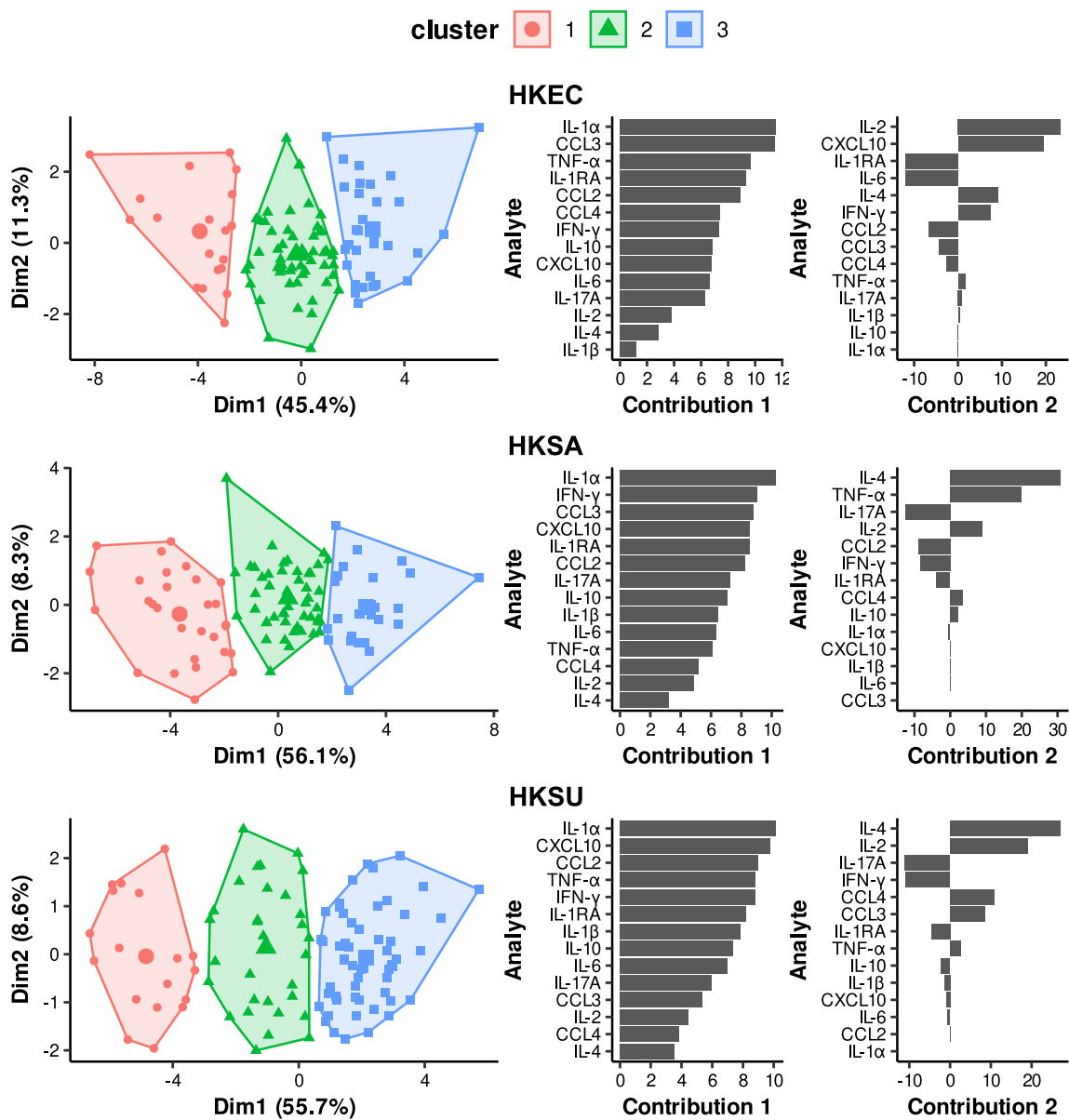


FIGURE 2.2. : HCPC conduite sur les concentrations des cytokines issues des situations HKEC, HKSA et HKSU. Dans le graphique des individus, chaque point représente une vache et ses forme et couleur correspondent au cluster auquel il appartient. Les axes des abscisses et des ordonnées correspondent aux composantes de l'ACP. La proportion de variance expliquée par chaque composante principale figure dans les parenthèses. Les contributions des cytokines à la première et la seconde composante principale sont représentées par des diagrammes à bâtons horizontaux.

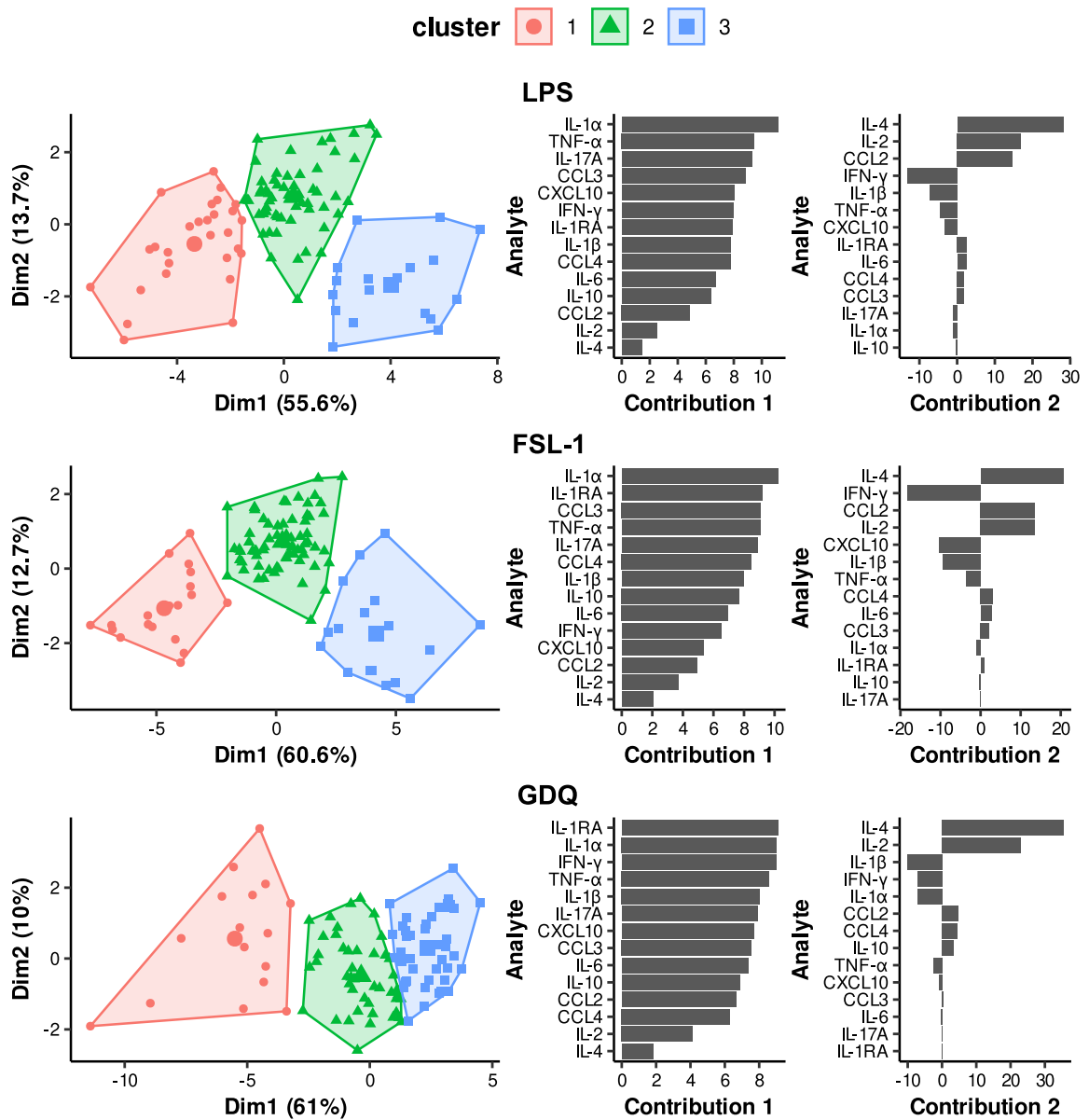


FIGURE 2.3. : HCPC conduite sur les concentrations des cytokines issues des situations LPS, FSL-1 et GDQ. Dans le graphique des individus, chaque point représente une vache et ses forme et couleur correspondent au cluster auquel il appartient. Les axes des abscisses et des ordonnées correspondent aux composantes de l'ACP. La proportion de variance expliquée par chaque composante principale figure entre parenthèses. Les contributions des cytokines à la première et la seconde composante principale sont représentées par des diagrammes à bâtons horizontaux.

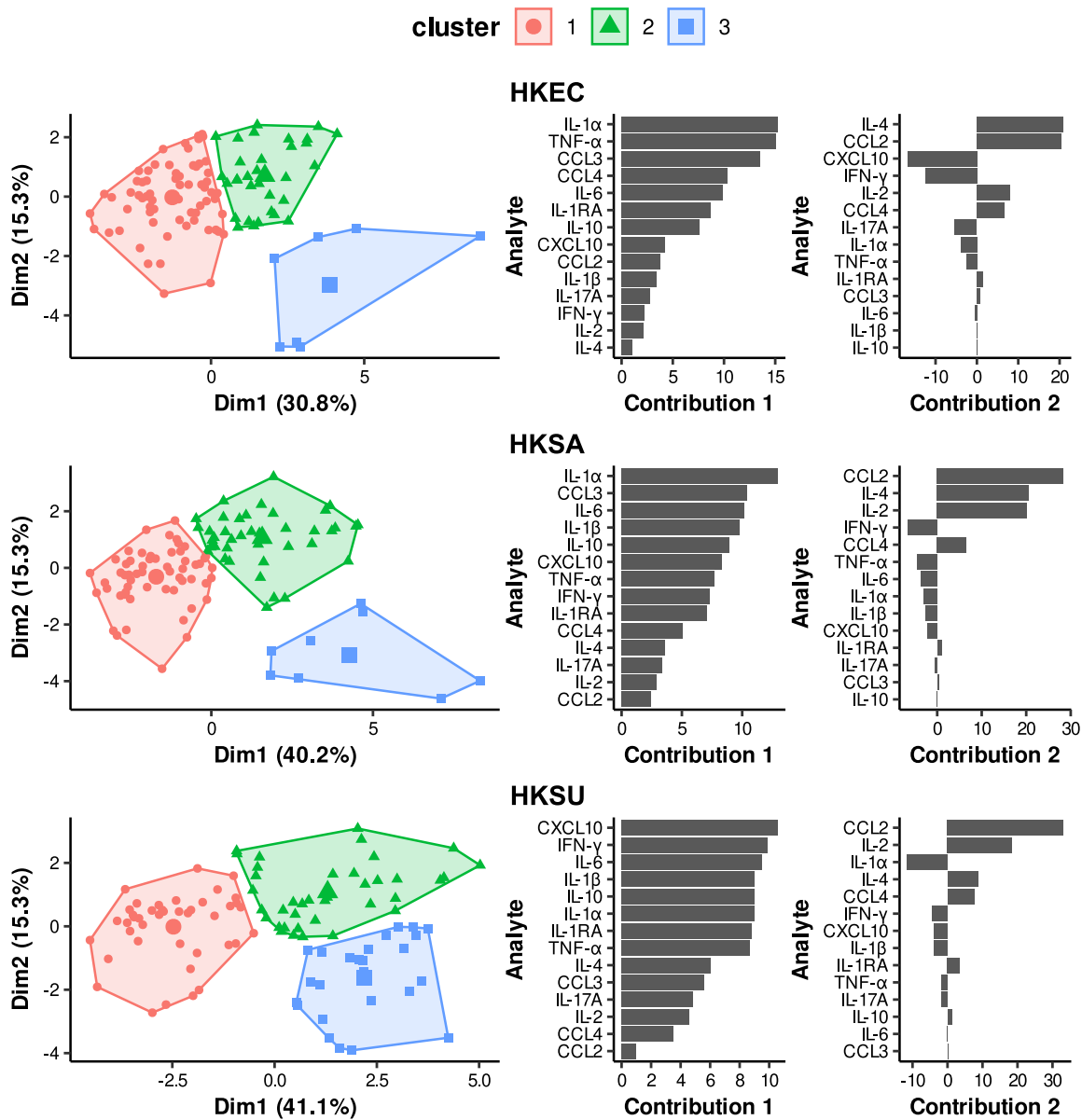


FIGURE 2.4. : HPCP conduite sur les valeurs delta des concentrations des cytokines issues des situations HKEC, HKSA et HKSU. Dans le graphique des individus, chaque point représente une vache et ses forme et couleur correspondent au cluster auquel il appartient. Les axes des abscisses et des ordonnées correspondent aux composantes de l'ACP. La proportion de variance expliquée par chaque composante principale figure entre parenthèses. Les contributions des cytokines à la première et la seconde composante principale sont représentées par des diagrammes à bâtons horizontaux.

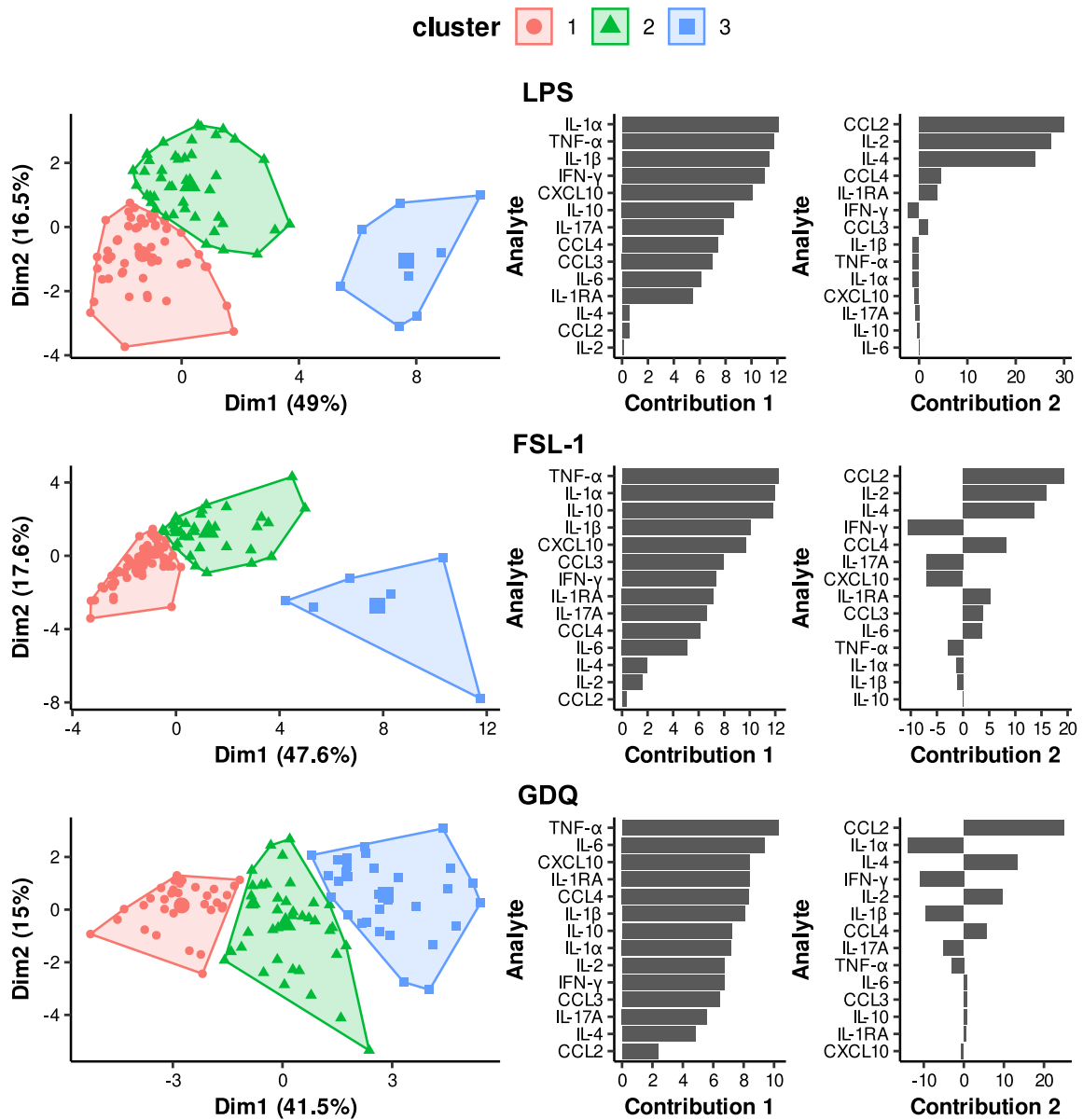


FIGURE 2.5. : HCPC conduite sur les valeurs delta des concentrations des cytokines issues des situations LPS, FSL-1 et GDQ. Dans le graphique des individus, chaque point représente une vache et ses forme et couleur correspondent au cluster auquel il appartient. Les axes des abscisses et des ordonnées correspondent aux composantes de l'ACP. La proportion de variance expliquée par chaque composante principale figure entre parenthèses. Les contributions des cytokines à la première et la seconde composante principale sont représentées par des diagrammes à bâtons horizontaux.

sur la première composante. Les *clusters* étaient donc disposés le long d'un gradient d'activation de la réponse immunitaire innée, de son contrôle et de la polarisation de la réponse immunitaire adaptative vers le type 3. Ce gradient était croissant du *cluster* 1 au 3.

Les premières composantes issues des ACP menées sur les valeurs *delta* des bactéries (Figure 2.4) étaient principalement influencées par IL-1 α , TNF- α , IL-6, IL-10. Toutefois, HKSU se distinguait d'HKEC et HKSA par une contribution relative importante de l'IFN- γ tandis que les deux autres comptaient toutes les deux la chimiokine CCL3 parmi leurs plus forts contributeurs. La seconde composante était principalement influencée par CCL2, IL-2 et IL-4. Ainsi, l'intensité de la réponse immunitaire innée était croissante du *cluster* 1 au 3. De plus, les *cluster* 1 et 2 présentaient des sécrétions plus élevées de cytokines impliquées dans la polarisation de la réponse immunitaire innée.

Pour ce qui est des ACP conduites sur les valeurs *delta* des ligands des TLR (Figure 2.5), les cytokines présentant les contributions relatives les plus élevées étaient TNF- α , IL-10, IL-1 β , CXCL10 et IL-1 α . GDQ se distinguait des deux autres *stimuli* par une contribution plus importante d'IL-6. Les secondes composantes étaient principalement influencées par CCL2, IL-2 et IL-4 pour le LPS et FSL-1, et CCL2, IL-1 α et IL-4 pour GDQ.

Pour le LPS et FSL-1, le *cluster* 3 était caractérisé par des valeurs *deltas* élevées pour des cytokines impliquées dans la réponse immunitaire innée tandis que le *cluster* 2 se distinguait du *cluster* 1 par des valeurs *deltas* plus élevées pour des cytokines impliquées dans la polarisation de la réponse immunitaire adaptative. Enfin, les *clusters* de GDQ étaient disposés selon un gradient croissant avec l'intensité de la réponse immunitaire innée et de son contrôle.

Caractérisation des *clusters*

Des tests de la somme des rangs de Wilcoxon et de Fisher ont été mis en œuvre pour identifier, respectivement, les variables continues et discrètes caractérisant les *clusters* de chaque partition. Pour les HCPC conduites sur les concentrations des cytokines, les tests de comparaison ont mis en évidence des différences significatives

de concentrations de BHB_s en absence de stimulation et en réponse à GDQ, de concentrations de BHB₅₀₋₆₀ en réponse au LPS et à FSL-1, et de rapports TB/TP₁₄ en réponse à HKSA (Figure 2.6). L'ensemble de ces différences a été observé entre les *clusters* 1 et 3. Concernant les variables discrètes, les tests de Fisher ont montré une hausse du rang de lactation du *cluster* 1 au *cluster* 2 en réponse au LPS et à FSL-1, et du *cluster* 1 jusqu'au *cluster* 3 en réponse à GDQ. De plus, dans la situation FSL-1, le *cluster* 3 contenait une proportion plus élevée de vaches gestantes que le *cluster* 1.

Pour les HCPC conduites sur les valeurs *delta*, les *clusters* 1 et 2 se distinguaient par des différences d'INLAIT, de concentration de BHB₅₀₋₆₀ et de FPCM₃₀₅ en réponse à HKEC, FSL-1 et HKSA, respectivement (Figure 2.7). En réponse à GDQ, les différences significatives observées concernaient l'INEC, les rapports TB/TP autour du pic de lactation et à la date d'échantillonnage. Ces dernières ont été observées entre les *clusters* 1 et 2, mais aussi entre les *clusters* 1 et 3 pour l'INEC. Les tests de Fisher ont montré des proportions de primipares plus élevées et de vaches gestantes plus faibles dans le *cluster* 1 de la situation GDQ.

Ainsi, les concentrations absolues des cytokines augmentent lorsque le BHB₅₀₋₆₀ et le rang de lactation (GDQ) croissent (LPS et FSL-1), et lorsque le BHB_s (CTL et GDQ) et le rapport TB/TP₁₄ (HKSA) diminuent. Pour le LPS et FSL-1, le rang de lactation est principalement associé à une augmentation des sécrétions d'IL-2, d'IL-4 et de CCL2. Concernant les valeurs *deltas*, leurs valeurs globales sont croissantes avec l'INEC (GDQ). Les valeurs *deltas* de CCL3, CCL4, IL-1RA et IL-6 augmentent avec les concentrations de BHB₅₀₋₆₀ (FSL-1). Enfin, les valeurs *deltas* de CCL2, IL-2 et IL-4 augmentent avec le FPCM₃₀₅ (HKSA). Ces relations entre les index génétiques, les caractères phénotypiques et les sécrétions de cytokines sont cohérentes avec celles observées via les régressions linéaires.

Comparaison des partitions

Les similitudes entre les partitions ont été mesurées à l'aide de l'indice de Rand ajusté (ARI) (Figure 2.8). Bien que la répartition des individus dans les *clusters* n'était pas liée au hasard dans de nombreux cas, les similitudes entre les partitions étaient globalement faibles. Cependant, certaines d'entre elles étaient relativement

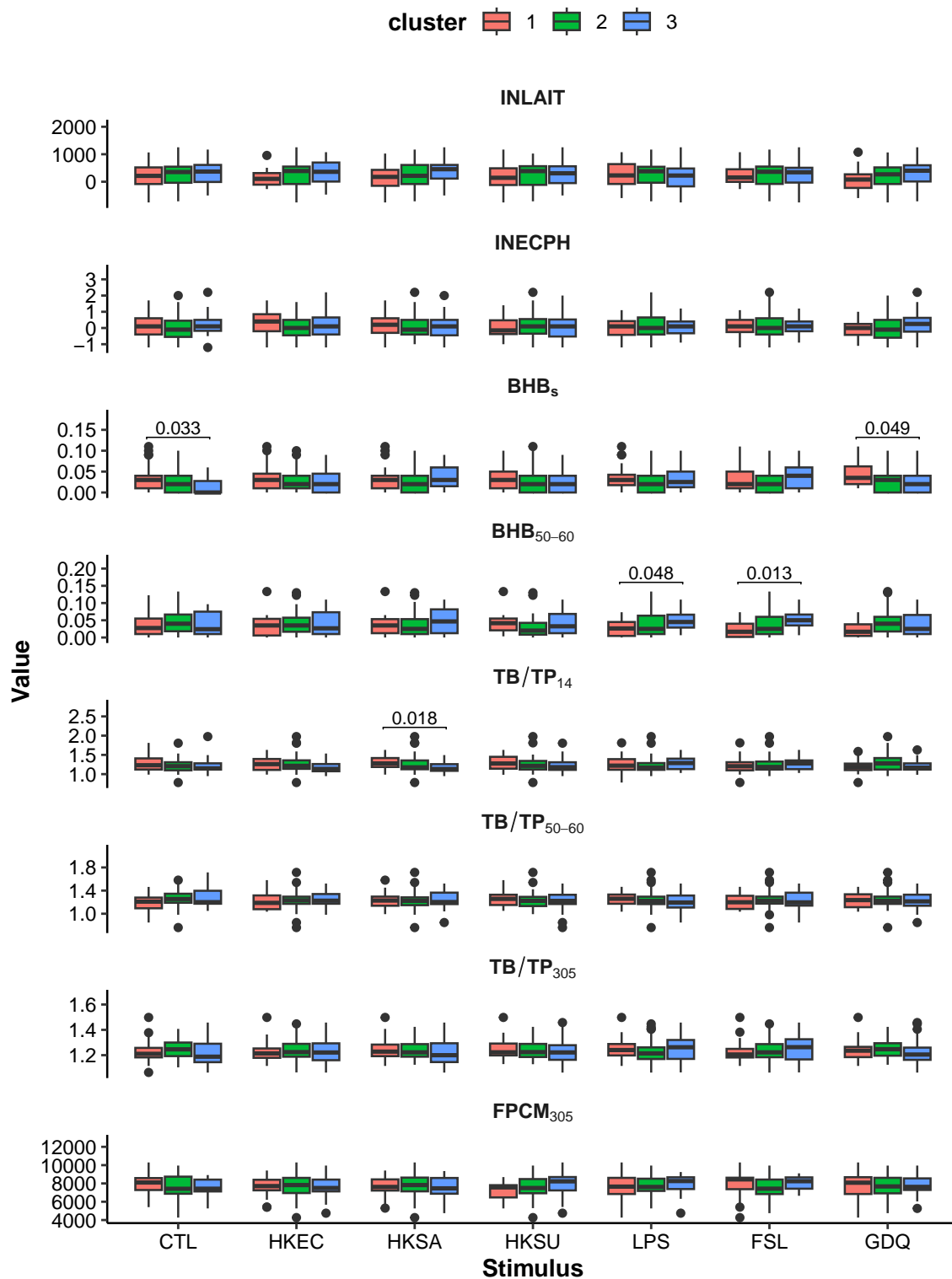


FIGURE 2.6. : Distribution des index génétiques et des caractères phénotypiques au sein de chaque cluster issu des HCPC conduites sur les concentrations absolues des cytokines. Les clusters ont été comparés deux à deux au moyen d'un test de la somme des rangs de Wilcoxon corrigé par la méthode de Benjamini-Hochberg. Seules les comparaisons significatives apparaissent sur la figure.

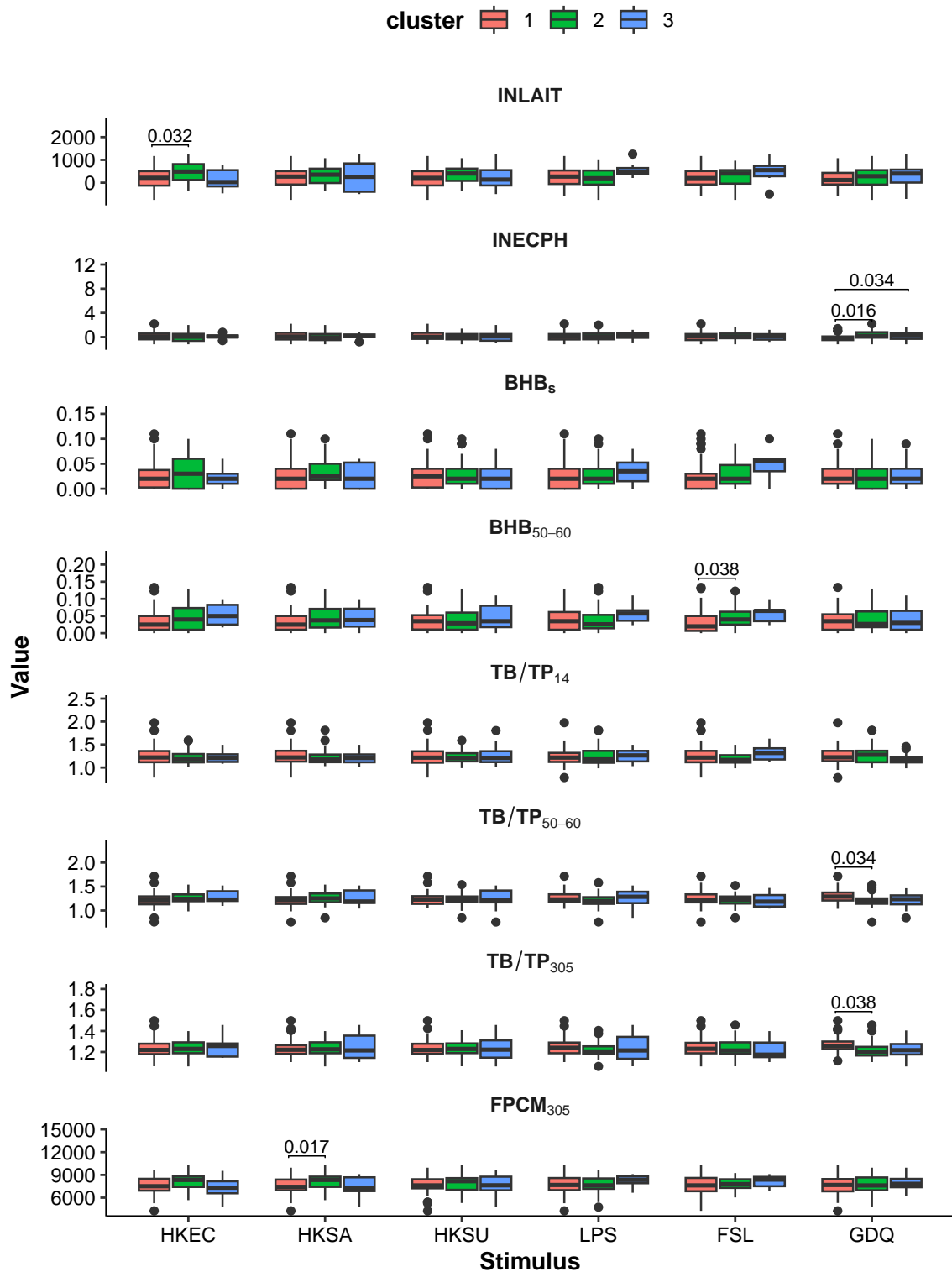


FIGURE 2.7. : Distribution des index génétiques et des caractères phénotypiques au sein de chaque cluster issu des HCPC conduites sur les valeurs delta des cytokines. Les clusters ont été comparés deux à deux au moyen d'un test de la somme des rangs de Wilcoxon corrigé par la méthode de Benjamini-Hochberg. Seules les comparaisons significatives apparaissent sur la figure.

élevées : FSL-1 vs. LPS, HKEC_{delta} vs. HKSA_{delta}, HKEC vs. HKSA, LPS_{delta} vs. FSL-1_{delta}, et les ligands bactériens vs. leurs valeurs *delta* respectives. Ces similitudes suggèrent que les vaches auraient des réponses similaires d'un *stimulus* à l'autre.

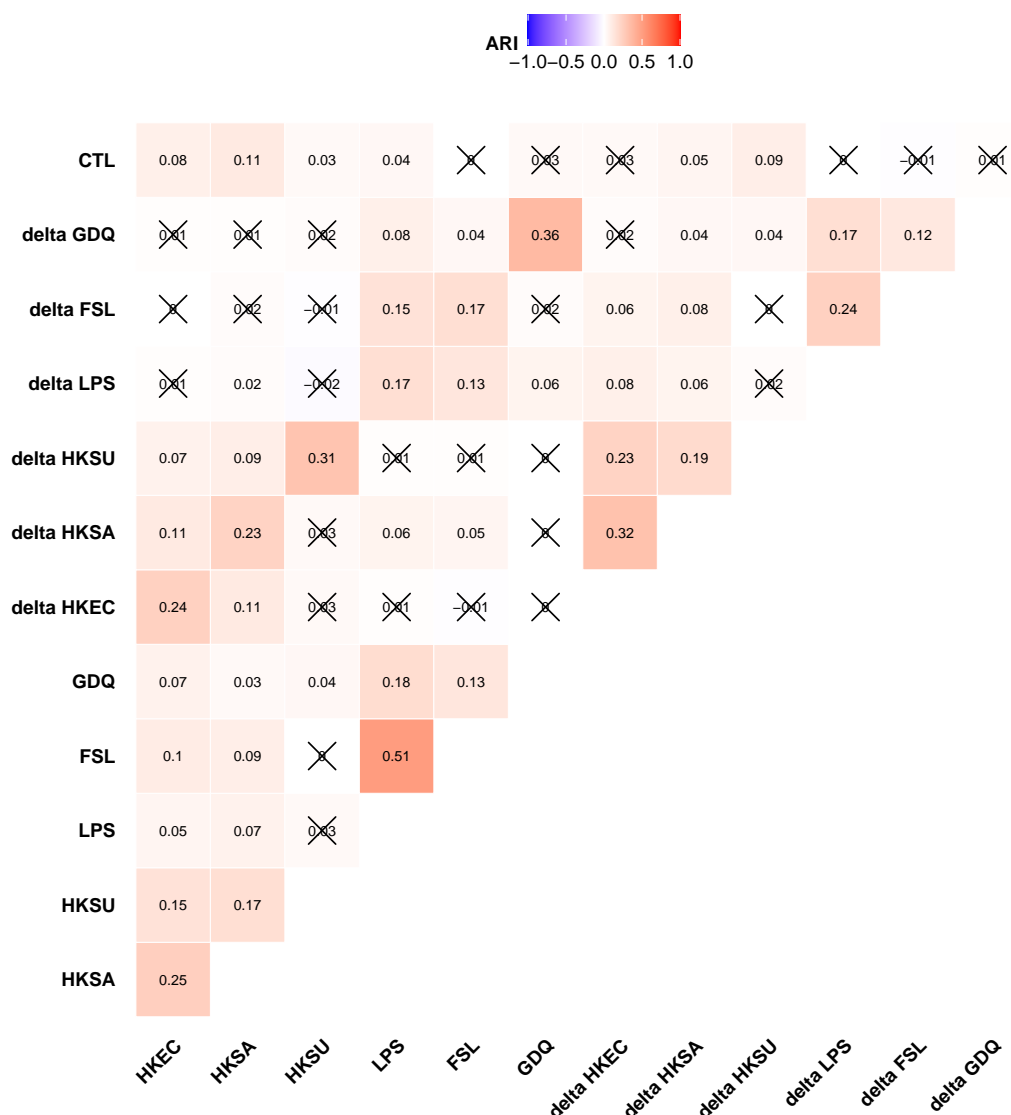


FIGURE 2.8. : Similitudes entre les différentes partitions issues des HCPC, évaluées par l'indice de Rand ajusté.

Les distributions des cytokines étant continues, les HCPC n'ont pas permis de définir des *clusters* nettement séparés les uns des autres, à l'exception des valeurs *delta* obtenues en réponse à HKEC, HKSA, LPS et FSL-1. Ainsi, la discrétisation de l'information permise par l'HCPC a induit une perte d'information trop importante pour étudier les similitudes des partitions.

Corrélations entre les composantes principales

La première composante de chaque ACP expliquant entre un et deux tiers de la variance des différentes cytokines étudiées, l'analyse des coefficients de corrélation de Spearman entre celles-ci a permis de palier le problème de discrétisation de l'HCPC tout en agrégeant l'ensemble des cytokines en une seule variable. En effet, les premières composantes principales obtenues, d'une part, pour les bactéries et, d'autre part, pour les ligands des TLR sont fortement corrélées (Figure 2.9). Ce constat est valable pour les concentrations brutes mais aussi pour les valeurs *delta*. Ainsi, l'intensité de la réponse cytokinique des vaches laitières serait similaire d'une bactérie à l'autre et d'un ligand des TLR à l'autre. Toutefois, comme vu dans le premier article de l'étude, chaque *stimulus* possède sa propre signature cytokinique.

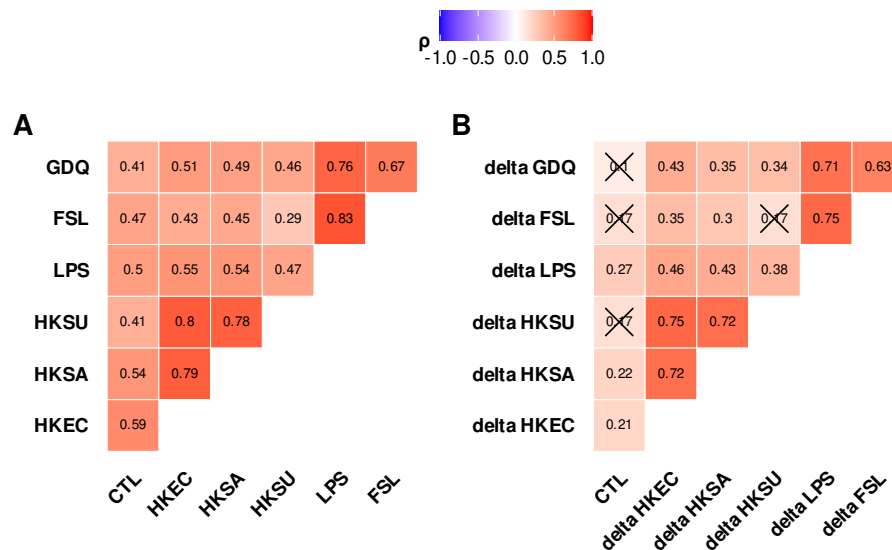


FIGURE 2.9. : Corrélations de Spearman entre les composantes principales issues des ACP conduites sur les concentrations (A) et les valeurs delta (B) des cytokines.

2.4.2.2. Conclusion

Comme pour la stimulation par le LPS, les analyses conduites sur l'ensemble des *stimuli* ont permis de mettre en évidence une importante diversité de profils cytokiniques caractérisée par des vaches faiblement et fortement répondeuses. Par ailleurs, la comparaison des profils cytokiniques a mis en évidence, non seulement,

des similitudes dans les profils de réponse au sein d'un même type de *stimulus*, mais aussi, des différences importantes entre une bactérie donnée et les ligands activant les mêmes TLR. L'étude de la réponse immunitaire vis-à-vis d'une bactérie ne peut donc pas se résumer à un unique antigène. Enfin, les réponses aux stimulations par *S. uberis* et GDQ ont montré une forte singularité par rapport aux autres *stimuli*. Ces observations étaient également visibles dans les analyses intra-individuelles du premier article.

Discussion générale

L'ensemble de nos travaux a permis de décrire la diversité de réponse des cellules sanguines chez des vaches laitières en lien avec leur fond génétique, leur parcours de vie et leurs performances. Cette description a montré que la compétence immunitaire, évaluée à travers la réponse sanguine à divers *stimuli* bactériens, n'était pas un caractère phénotypique catégoriel variant selon le *stimulus*, mais plutôt un caractère phénotypique continu et relativement constant entre les différents *stimuli* investigués, dans le cadre analytique que nous avons développé.

Dans le premier volet de l'étude, la stimulation d'échantillons de sang total a mis en évidence des signatures cytokiniques propres à trois isolats représentant les principaux agents responsables de mammites (*Escherichia coli*, *Streptococcus aureus* et *Streptococcus uberis*) dans l'espèce bovine. Ces signatures ont été identifiées grâce au développement original et combiné d'un protocole de stimulation du sang, d'une méthode de multiplexage reposant sur une technique d'immuno-analyse utilisant des billes magnétiques, et d'un algorithme de *machine learning* supervisé, la PLS-DA. Dans un second volet, nous avons cherché à investiguer dans quelle mesure la réponse immunitaire des vaches laitières était influencée par des caractères génétiques et phénotypiques, aussi bien en l'absence qu'en présence d'un *stimulus*. Ces travaux constituent une première étape vers l'identification de biomarqueurs qui permettraient d'évaluer de façon innovante et relativement aisée, la compétence immunitaire des vaches laitières.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, l'évaluation de la compétence immunitaire pourrait servir dans les schémas de sélection génétique des bovins laitiers ou dans l'évaluation de diverses mesures zootechniques pour réduire la prévalence des maladies, avec des animaux plus résistants aux maladies infectieuses endémiques, en particulier les mammites. L'intégration à large échelle d'un tel critère

nécessite d'être facile à mesurer, peu coûteux et bien corrélé aux caractères que l'on veut améliorer. À cette fin, la méthode développée et mise en œuvre dans le cadre de cette thèse présente de nombreux atouts et a permis de produire des connaissances de grand intérêt.

3.1 Stimulation *ex vivo* de sang total et technologie Luminex[®] xMAP[®] : une combinaison fiable et simple à mettre en œuvre

Contrairement à la méthode HIR (47), l'utilisation des cytokines comme biomarqueurs pour évaluer la réponse immunitaire ne requiert pas d'immunisation préalable, ce qui présente plusieurs avantages. En effet, l'approche que nous avons utilisée ne nécessite qu'une seule intervention sur les vaches pour prélever les échantillons sanguins. Une intervention unique présente aussi l'avantage de limiter les manipulations, qui sont chronophages, et de réduire le stress imposé aux animaux (381) ; elle constitue un gain logistique significatif. De plus, s'affranchir d'une immunisation préalable permet d'éviter de faire subir un stress immunitaire aux animaux (382). Par ailleurs, le recours à une immunisation à des fins non préventives ou curatives et en dehors d'un cadre disposant d'une autorisation de mise sur le marché est discutable d'un point de vue éthique et réglementaire.

En dosant simultanément un large panel de cytokines, la trousse développée par notre équipe avec Merck-Millipore[®] pour la technologie Luminex[®] xMAP[®] autorise aussi bien l'investigation de la réponse immunitaire innée que la réponse adaptative pour un antigène donné, en mettant l'accent sur la réponse à médiation cellulaire. Ce dernier point est à souligner car la majorité des études portant sur la compétence immunitaire s'intéresse principalement à sa composante médiée par les anticorps (383). Comme mentionné précédemment, la méthode HIR permet également d'évaluer la réponse à médiation cellulaire au moyen de la mesure du pli cutané. Ce dernier permet la mesure de la réaction d'hypersensibilité retardée à un *stimulus*, un type particulier de réponse à médiation cellulaire. Via l'utilisation

des cytokines comme marqueurs de la réponse immunitaire, notre méthode permet d'approcher la réponse à médiation cellulaire dans sa globalité (384).

À l'instar de la technologie Luminex[®] xMAP[®], les tests ELISA permettent de doser des composés divers comme les anticorps ou les cytokines (385). Cependant, la méthode ELISA ne permet pas le multiplexage et requiert donc autant de dosages répétés que de cibles à doser. Grâce au caractère multiplex de la technologie Luminex[®] xMAP[®], le dosage des cytokines nécessite un nombre très réduit de manipulations des échantillons et accroît la fiabilité des mesures tout en réduisant les coûts analytiques. Par ailleurs, le développement d'une méthode de stimulation du sang tout-en-un en plaçant, en amont du prélèvement, l'agent de stimulation directement dans la seringue destinée à recueillir l'échantillon de sang, permet également de réduire les manipulations de l'échantillon et l'activation non spécifique des cellules immunitaires.

Par son caractère *ex vivo*, la stimulation de sang total employée dans notre méthode permet de tester une multitude d'antigènes différents sur un seul et même animal, chose non réalisable par des approches *in vivo* reposant sur une immunisation ou une intradermoréaction. La stimulation *ex vivo* permet donc d'étudier un plus grand nombre de facettes de la réponse immunitaire. De plus, le sang est une matrice biologique accessible à tout stade de la vie d'une vache, contrairement au lait qui nécessite une première mise bas, n'est pas disponible durant la période sèche et est difficilement accessible pour les races allaitantes. Le sang est donc un support de choix pour évaluer précocement la compétence immunitaire.

Ainsi, la méthode développée dans cette thèse présente de nombreuses qualités qui pourraient en faire une méthode de référence pour évaluer la compétence immunitaire des vaches laitières. Ces qualités ont été mises à contribution pour explorer la diversité intra- et interindividuelle de la réponse immunitaire.

3.2 Des signatures cytokiniques propres à chaque *stimulus*

L'emploi d'une PLS-DA *multilevel* sur les MFI ajustées des cytokines après stimulation a mis en évidence des profils cytokiniques spécifiques à un stimulus donné. La discrimination était particulièrement performante pour les *stimuli* bactériens (HKEC, HKSA et HKSU) avec un taux de mauvaise classification de seulement 1,5% en utilisant uniquement les deux premières composantes de la PLS-DA. Parmi les cytokines du panel de départ, les plus discriminantes étaient l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL-1 α , l'IL-1 β et le CXCL8. Les *stimuli* se distinguaient les uns des autres principalement par l'intensité de la réponse innée qu'ils initient. La sPLS-DA a identifié trois cytokines permettant une discrimination satisfaisante des *stimuli* bactériens : l'IFN- γ , l'IL-1 β et le TNF- α . Le taux de mauvaise classification était de seulement 1,6% sur les trois premières composantes principales. Il est donc possible de réduire le panel de cytokines pour investiguer la variabilité intra-individuelle et, par la même occasion, de réduire les coûts.

Avec un taux de mauvaise classification de 6,8% sur les trois premières composantes, la PLS-DA s'est révélée moins performante pour discriminer les ligands des TLR que les bactéries. La diversité antigénique est probablement la cause de cette différence de pouvoir discriminant. En effet, les bactéries présentent un plus grand nombre de déterminants antigéniques que les ligands des TLR (386). Les bactéries sont donc susceptibles d'activer un plus large éventail de PRR et, donc, d'induire une réponse immunitaire plus stéréotypée. Les différences de diversité antigénique sont certainement à l'origine de la divergence constatée entre les signatures cytokiniques de certaines bactéries et les ligands activant les mêmes TLR.

L'aptitude de notre méthode à discriminer les *stimuli* bactériens permet d'envisager des applications diagnostiques, notamment pour identifier des agents étiologiques. Bien que les cultures bactériennes et la Polymerase Chain Reaction (PCR) permettent déjà de révéler la présence d'un agent pathogène, elles ne permettent pas de confirmer son implication dans un processus infectieux (387), contrairement aux signatures cytokiniques qui témoignent de l'activation spécifique du système

immunitaire. Notre protocole de dosage des cytokines préconise une incubation des échantillons en présence des billes pendant toute une nuit pour maximiser la capture des cytokines par les anticorps portés par les billes. Toutefois, à l'instar des autres tests immunologiques, ce temps d'incubation est très certainement réductible à quelques heures. Ainsi, notre méthode serait réalisable dans des délais similaires à ceux de la PCR et plus courts que ceux de la culture microbiologique. À titre d'exemple, l'une des méthodes employées pour détecter la tuberculose est le test de dosage de l'IFN- γ . Ce test présente une sensibilité et une spécificité de 88,1% et de 62,3%, respectivement (388). En se basant sur un plus grand nombre de cytokines, notre méthode pourrait aussi améliorer les performances de détection de la tuberculose (389).

L'utilisation de panels de cytokines étant une approche relativement récente, le prétraitement des données pose encore question. Les dosages des cytokines ont été exploités sous trois formes : les MFI brutes, les MFI ajustées à la moyenne et les concentrations. Pour rappel, les MFI brutes correspondent aux données produites par le logiciel xPONENT[®] à partir des données brutes de l'appareil de lecture (MAGPIX[®]), les concentrations sont le résultat de la conversion des MFI brutes au moyen des courbes dose-réponse et les MFI ajustées à la moyenne correspondent à un écart de sécrétion par rapport à un profil moyen (354). Les courbes dose-réponse étant sigmoïdes, la conversion des MFI brutes en concentrations entraîne une amplification des valeurs à l'approche des asymptotes et impose de définir un intervalle de quantification. Travailler sur les MFI brutes permet donc de travailler sur l'ensemble des valeurs, y compris celles situées en-dehors de l'intervalle de quantification. Cependant, les MFI sont propres à chaque système de dosage et ne peuvent donc pas être comparées d'une étude à l'autre. De ce point de vue, le travail sur les concentrations autorise justement la comparaison des dosages avec d'autres dispositifs en plaçant les valeurs dans un même référentiel. En matière de discrimination des *stimuli*, les MFI brutes donnent des résultats similaires à ceux obtenus avec les concentrations. Cette similitude s'explique par la présence de la plupart des dosages de cytokines dans les intervalles de quantification, les courbes dose-réponse étant quasiment linéaires sur ces intervalles. Les MFI ajustées

à la moyenne ont montré des performances de discrimination très bonnes mais le sens des variables diffère de celui des MFI brutes et des concentrations. Leur interprétation pose encore des questions auxquelles une approche intégrative comme la nôtre ne permet pas de répondre.

L'amélioration du taux de mauvaise classification en adoptant une approche *multilevel* souligne l'importance de prendre en compte la structure de l'échantillonnage lorsque l'indépendance des échantillons n'est pas vérifiée. En effet, l'approche *multilevel* extrait la variabilité intra-individuelle et efface la variabilité interindividuelle (390).

Comme mentionné précédemment, les signatures cytokiniques associées aux *stimuli* bactériens diffèrent principalement par les sécrétions de cytokines impliquées dans la réponse immunitaire innée. Cette dernière est connue pour sa reconnaissance non spécifique des agents pathogènes via un système de récepteurs invariables (391) ; nos résultats suggèrent au contraire que le profil de réponse est bien spécifique à l'agent qui l'a induit. Cette spécificité est observable au sein même d'une espèce bactérienne puisque deux souches distinctes peuvent induire des profils de sécrétion différents (392). Ces sécrétions jouent un rôle important dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative, son orientation (393) et la persistance des agents pathogènes (392).

La stimulation *ex vivo* d'échantillons de sang total, combinée à la technologie Luminex® xMAP® et à une PLS-DA *multilevel*, a permis d'investiguer la diversité intra-individuelle en mettant en évidence l'existence de signatures cytokiniques propres à chaque *stimulus*. L'amélioration de la discrimination des *stimuli* apportée par l'approche *multilevel* suggérait la présence d'une importante diversité interindividuelle de la réponse immunitaire. Cette variabilité est apparue associée à des facteurs génétiques et environnementaux.

3.3 Une compétence immunitaire variable selon des facteurs génétiques et environnementaux

Les modèles de régression linéaire et les HCPC conduites sur les concentrations des cytokines ont principalement mis en évidence une relation entre la réponse immunitaire et le rang de lactation ou l'âge, et une association entre les profils de réponse cytokinique et le statut métabolique.

Dans notre étude, une augmentation globale des concentrations de cytokines avec le rang de lactation a été observée. Cette évolution pourrait être liée au phénomène d'immunosénescence. Ce phénomène a été décrit chez de nombreuses espèces et a été illustré récemment chez l'homme, lors d'infections par le SARS-CoV-2, par l'« orage cytokinique » observé plus fréquemment chez les personnes âgées (394). Jusqu'à présent, l'immunosénescence des bovins a été décrite par des études transcriptomiques conduites sur les cellules mononucléées du sang périphérique (356,357). À notre connaissance, nos travaux sont les premiers à suggérer une immunosénescence en se basant sur les concentrations plasmatiques de nombreuses cytokines. Avec une apparition dans le premier cinquième de l'espérance de vie naturelle (395), les premiers signes d'immunosénescence sont étonnamment précoces chez la vache laitière. À titre de comparaison, les premiers signes d'immunosénescence apparaissent à partir de 40 ans dans l'espèce humaine (396), soit à la moitié de l'espérance de vie moyenne d'un Européen (397). Nos résultats ne permettent pas de dire si cette immunosénescence accélérée est liée à un effet de l'âge, de la lactation ou à un effet combiné des deux. Toutefois, compte tenu d'une longévité des vaches non productives d'environ 20 ans (395), l'hypothèse la plus probable est un effet de la lactation. Celle-ci pourrait être vérifiée en employant notre protocole sur des vaches laitières non mises à la reproduction. Si cette hypothèse est validée, les mesures de maîtrise nécessiteront de réviser les critères de sélection sur les caractères de production.

Les concentrations des cytokines sécrétées étaient associées positivement aux concentrations de BHB dans le lait autour du pic de lactation, marqueur du bilan énergétique. Comme mentionné dans l'introduction générale, le paradigme selon

lequel le déficit énergétique est à l'origine d'une baisse de la compétence immunitaire a été remis en question du fait de l'absence d'un lien de causalité clairement établi (200). Malheureusement, les méthodes employées dans nos travaux n'ont pas permis d'établir un tel lien.

Concernant la santé mammaire, une augmentation des valeurs de l'INCELL était globalement associée à une diminution de l'intensité de la réponse cytokinique. Malgré un fort effet des facteurs environnementaux, cette association suggère que des déterminants génétiques impliqués dans l'INCELL le sont aussi dans la compétence immunitaire globale des vaches laitières. Une étude très récente portant sur les paramètres génétiques influençant les CCS corrobore cette hypothèse (398). En effet, 32 gènes ont été identifiés comme influençant significativement les CCS de vaches Prim'Holstein chinoises, certains d'entre eux étant impliqués dans le contrôle de la réponse inflammatoire, la réponse cellulaire et les voies de signalisation des TLR. En particuliers, l'un des SNPs identifiés dans cette étude concerne le gène CD44. Chez la vache laitière, ce gène code une protéine transmembranaire jouant un rôle dans la médiation et le contrôle du recrutement des cellules mononucléées du sang (399). Plus précisément, cette protéine permet l'adhésion des cellules mononucléées à l'acide hyaluronique et aux cellules épithéliales mammaires. Compte tenu de l'implication de ces gènes dans le recrutement des cellules immunitaires, il paraît logique qu'ils jouent un rôle dans la compétence immunitaire, au-delà du cadre des mammites.

Nos travaux ont mis en évidence une association entre les sécrétions de cytokines et le niveau de production, évalué par la production laitière corrigé par les taux de matières utiles (FPCM). Jusqu'à présent, le FPCM était principalement utilisé dans les analyses de cycle de vie pour évaluer l'empreinte carbone des filières laitières (400). En prenant en compte les matières utiles du lait, le FPCM reflète davantage la réelle demande métabolique liée à la production laitière. Compte tenu de l'association existant entre le bilan énergétique et la réponse immunitaire, l'utilisation du FPCM s'avère pertinente dans notre étude. Le seul inconvénient est la rareté des études utilisant ce mode d'évaluation de la production laitière pour comparer nos résultats. D'après les concentrations d'IL-17A, les vaches ayant un FPCM₃₀₅ élevé ont montré

une meilleure capacité à développer une réponse immunitaire de type 3 et à la moduler. Cette aptitude à orienter correctement la réponse immunitaire met en exergue l'importance d'intégrer la compétence immunitaire dans les schémas de sélection, aussi bien d'un point de vue fonctionnel que productif.

Ainsi, nos travaux ont permis non seulement d'investiguer la diversité interindividuelle de la réponse immunitaire mais aussi d'identifier des facteurs génétiques et environnementaux expliquant en partie cette diversité.

3.4 Une compétence immunitaire similaire d'un *stimulus* bactérien à l'autre

Bien que l'analyse de la variabilité intra-individuelle du premier volet de nos travaux ait montré que les profils cytokiniques différaient fortement d'un *stimulus* à l'autre, l'analyse de la variabilité interindividuelle a montré une intensité de réponse similaire entre, d'une part, les *stimuli* bactériens et, d'autre part, les ligands des TLR. Dans le cadre de l'investigation de la diversité de la réponse immunitaire, ces résultats sont très intéressants car ils montrent que l'intensité de la réponse immunitaire est similaire quel que soit le *stimulus* bactérien employé, tout en conservant une signature cytokinique propre à chacun d'entre eux. Ces résultats suggèrent que les phénotypes immunitaires ne seraient pas de nature catégorielle avec des vaches fortement répondeuses à certains agents pathogènes et faiblement répondeuses à d'autres, mais plutôt continue avec des vaches ayant une intensité de réponse cellulaire propre et indépendante de l'agent pathogène en cause. Contre toute attente, les bactéries et les ligands censés activer les TLR correspondants étaient peu corrélés. Dans une expérience de stimulation *ex vivo* de sang total, un agent pathogène ne peut donc pas être réduit à l'un de ses antigènes. Par ailleurs, la diversité des agents pathogènes exploités dans notre étude étant relativement limitée, la similitude d'intensité de réponse immunitaire observée pour les trois agents pathogènes responsables de mammites mériterait d'être confirmée pour d'autres types d'agents (virus, parasites ...). Il est cependant intéressant de relever

les fortes corrélations entre les intensités de réponse lors des stimulations par le LPS, caractéristique des bactéries Gram négatives, et par GDQ, ligand du TLR7/8 permettant de simuler une infection virale.

3.5 Limites et pistes d'amélioration

Bien que les analyses aient permis de produire des connaissances intéressantes, elles présentent un certain nombre de limites principalement liées au caractère nouveau de ces informations. En effet, le recours aux méthodes de multiplexage à billes en immunologie bovine est très récent et suscite de nombreuses questions, notamment celles du prétraitement des données obtenues. Nous avons vu que les MFI pouvaient être traitées de différentes façons : nette, brute ou ajustée « à la moyenne ». Si le faible bruit généré par l'instrument de mesure (MAGPIX®) permet d'utiliser les MFI brutes plutôt que les MFI nettes sans perturber les analyses statistiques (352), l'usage des valeurs ajustées pose question. Dans le premier volet de cette thèse, cet ajustement a été conduit sur l'ensemble des conditions. Globalement, l'ensemble des conditions était distribué linéairement dans l'espace, à l'exception de la situation témoin sans stimulus. S'appuyant sur une régression linéaire prenant en compte l'ensemble des situations de mesure, l'ajustement « à la moyenne » a conduit à une surestimation des résidus pour la situation témoin. Un ajustement s'appuyant sur une régression non linéaire pourrait corriger ce biais. Toutefois, cette surestimation ne concernant que les cytokines dosées en situation témoin, les résultats du premier volet de nos travaux ne sont pas remis en question car les analyses ont été réalisées uniquement sur les mesures en condition de stimulation. La numération de la formule sanguine aurait également permis d'ajuster les sécrétions des cytokines à la concentration des cellules qui les produisent (granulocytes, lymphocytes, monocytes ...), et ainsi de voir si la variabilité interindividuelle de la sécrétion des cytokines était le fruit du nombre de leucocytes ou de leur capacité sécrétoire. Par ailleurs, les profils cytokiniques observés dans les conditions sous stimulation peuvent varier selon la nature des *stimuli* mais aussi de leur quantité. En supposant que les profils cytokiniques soient proportionnels à la quantité de *stimulus* appliquée, l'ajustement

« à la moyenne » serait suffisant pour prendre en compte l'effet de la quantité. En revanche, dans le cas contraire, les résultats de l'étude ne seraient pas généralisables mais se limiteraient à une quantité précise d'un *stimulus* donné. Toutefois, la concentration de chaque *stimulus* a été préalablement définie comme optimale, c'est-à-dire permettant d'induire une variation significative de la quantité de cytokines produite. Cela n'exclut pas que des différences interindividuelles puissent être observées avec des concentrations différentes des ligands d'activation ou avec d'autres souches bactériennes.

Le péripartum est la période pendant laquelle les vaches ont un risque accru de développer des troubles métaboliques et/ou infectieux. L'altération de la réponse immunitaire durant cette période n'est pas complètement comprise bien qu'une diminution du nombre de LT et de la production d'IFN- γ par les cellules mononucléées sanguines périphériques (PBMC) ait été décrite (401,402). Les échantillons de sang ayant été prélevés à distance de la période péripartum (101 ± 11 jours *postpartum*, soit environ trois mois après la mise bas), ils ne permettent pas de connaître la capacité immunitaire des vaches durant cette période de forte prédisposition aux maladies. L'objectif était justement de s'affranchir du développement possible d'affections de nature infectieuse ou métabolique à cette période qui aurait limité notre capacité à évaluer l'influence des index génétiques sur la variabilité interindividuelle de la réponse immunitaire.

La trousse de dosage proposée par Merck Millipore présente des performances satisfaisantes mais reste perfectible. En effet, pour la validation des trousse de dosage immunologique, il est préconisé de doser en triplicata les échantillons d'étalonnage et de disposer d'échantillons de contrôle à trois concentrations différentes (concentration donnant la moitié de la réponse maximale, et concentrations haute et basse proches des limites de quantification) (353). Cependant, le kit utilisé pour l'étude ne propose que des échantillons d'étalonnage en duplicata, et deux concentrations (haute et basse) pour les échantillons de contrôle. Il est également recommandé de vérifier l'existence de réactions croisées (353) réduisant la spécificité des dosages. Ces réactions croisées peuvent être spécifiques (présence dans l'échantillon d'un antigène quelconque présentant une affinité pour un anticorps normalement

dirigé vers un antigène d'intérêt) ou non spécifiques (présence dans l'échantillon de facteurs pouvant perturber la formation de la liaison anticorps-antigène, on parle aussi d'effet matrice) (403). Le fabricant du kit assure l'absence ou la présence négligeable de réactions croisées entre les cytokines/chimiokines du kit. L'absence d'effet matrice n'est pas précisée mais il est maîtrisé en préparant les échantillons d'étalonnage et de contrôle dans un milieu dont la composition est proche de celle des échantillons. La linéarité de la dilution et la stabilité du kit ont été vérifiées par le fabricant. Certaines cytokines ne couvrent pas la gamme des valeurs possibles pour un nombre relativement élevé d'animaux. En particulier, la concentration de la chimiokine CXCL8 est rapidement saturante, conduisant à une sous-estimation de la mesure. Ceci pourrait être amélioré en modifiant la gamme de mesure (affinité des anticorps, nombre de billes, temps d'incubation) ou en utilisant une dilution plus élevée des échantillons, aux dépens des autres cibles dont le dosage est déjà bien calibré. Il aurait été possible de tester plusieurs dilutions avec la même trousse de dosage mais, pour des raisons essentiellement financières, cela n'a pas pu être réalisé. De plus, le recours à plusieurs dilutions augmente le nombre de manipulations des échantillons et les biais associés. À l'inverse, les cytokines IL-1 α , IL-1 β et IL-17A sont en-deçà de la limite de quantification inférieure pour de nombreux échantillons en l'absence de stimulation, leur concentration basale étant extrêmement faible. La limite de quantification inférieure est la plus faible concentration comprise dans la gamme d'étalonnage ayant un %CV inférieur à 25%. Dans le cas d'IL-1 α et IL-17A, la limite de quantification inférieure correspond à la concentration de l'échantillon le moins concentré de la gamme d'étalonnage car la limite de quantification réelle est inférieure à cette dernière. Ainsi, un simple élargissement de la gamme d'étalonnage permettrait de faire diminuer la limite de quantification inférieure d'IL-1 α et IL-17A, et de couvrir leurs gammes de valeurs physiologiques. Cependant, dans notre cas, bien que la précision du dosage s'en trouverait augmentée, elle aurait peu d'intérêt pour l'investigation des phénomènes biologiques étudiés.

Les analyses réalisées sur les variables liées à la production laitière ont été conduites sur des valeurs agrégées. Cependant, l'agrégation ne permet pas de tenir compte de la dynamique de ces variables. Les *Functional Data Analysis* (FDA) sont

des méthodes d'analyse permettant justement de traiter des courbes et, donc, de prendre en compte l'évolution d'une variable au cours du temps. L'implémentation de telles méthodes dans des analyses futures permettrait sans doute de dégager des relations occultées par l'agrégation des valeurs, en différenciant des groupes de vaches ayant des trajectoires similaires pour les différents paramètres du lait étudiés. De plus, les méthodes de réduction de la dimensionnalité employées dans cette étude (ACP et PLS-DA) sont des méthodes linéaires. Ce choix a été fait car il facilite l'interprétation des relations liant les variables aux *clusters* mais aussi les variables entre elles. Cependant, les phénomènes étudiés ne sont pas forcément linéaires. Des méthodes non linéaires telles que l'algorithme *t-distributed Stochastic Neighbor Embedding* (t-SNE) ou encore l'*Uniform Manifold Approximation and Projection* (UMAP) mériteraient d'être investiguées à l'avenir.

S'il est certain que le multiplexage à billes offre une fidélité plus élevée que celle de l'ELISA du fait d'un nombre réduit de manipulations, cette fidélité n'est pas si élevée dans l'absolu. Par exemple, la fidélité des dosages ayant recours à la chromatographie est bien meilleure (%CV < 10%) (404). De plus, la fidélité a été évaluée par le biais du %CV qui intègre, par définition, une pondération par la réponse moyenne. Dans l'absolu, les variations sont donc beaucoup plus importantes pour les MFI élevées. Certes, le manque de fidélité n'a pas empêché de mettre en évidence des signatures cytokiniques propres à chaque stimulus bactérien. Cependant, il peut être problématique si les phénotypes immunitaires reposent sur des différences de sécrétion subtiles. De plus, les dosages immunologiques souffrent également d'une variabilité inter-essai relativement importante mais compensée, en partie, par un étalonnage et des contrôles pour chaque série de mesures.

Les études sur sang total nécessitent d'utiliser un anticoagulant au moment du prélèvement. L'anticoagulant choisi dans cette étude est l'héparine. Au-delà de ses propriétés anticoagulantes, l'héparine est connue pour ses effets anti-inflammatoires et sa capacité à se lier à l'IL-6 et l'IFN- γ (405). Le recours à l'héparine comme anticoagulant peut donc être une source de biais. Toutefois, l'usage d'un autre anticoagulant tel que l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA), un chélateur du calcium, peut aussi être une source de biais du fait du rôle du calcium dans

l'exocytose des cytokines (106). D'ailleurs, une étude s'est intéressée aux effets de l'anticoagulant sur le dosage de cytokines via un multiplexage à billes (406). Cette étude a montré que les valeurs obtenues avec de l'héparinate de lithium différaient de celles obtenues avec de l'EDTA.

3.6 Perspectives

Les signatures cytokiniques propres à chaque *stimulus* bactérien sont des résultats prometteurs ouvrant la voie à l'utilisation du Milliplex® à des fins de diagnostic des agents de mammite. Cependant, la réalisation de ce type de diagnostic sur des échantillons de lait s'avère plus compliquée du fait de la présence de lipides en grande quantité (globules gras, micelles ...) à l'origine d'un effet matrice non négligeable (407). Toutefois, des résultats probants ont d'ores et déjà été obtenus avec du lait de vache (408).

Comme pour la méthode HIR, la suite logique de nos travaux est l'élaboration d'un système de notation de la compétence immunitaire. Un tel système permettrait d'agrèger les profils cytokiniques en une seule valeur et faciliterait l'identification de déterminants génétiques associés à la compétence immunitaire.

Comme exposé précédemment, le péripartum est une période charnière marquée par une diminution de la réponse immunitaire et une plus grande prédisposition aux infections. Une étude s'intéressant à la diversité interindividuelle des réponses immunitaires durant cette période paraît donc judicieuse. Il s'agit justement de l'objet du projet *Microsigns* qui a pour ambition de mesurer la réponse au LPS à deux dates encadrant le vêlage chez 425 vaches laitières issues de 25 troupeaux commerciaux, en plus de la détermination des communautés bactériennes fécales comme biomarqueurs de la bonne santé des vaches laitières. Ce projet permettra donc de connaître les altérations de la production basale de cytokines autour de la mise bas et de déterminer la dynamique des profils cytokiniques durant cette période, y compris après activation de la réponse immunitaire innée. Au-delà de l'augmentation de la taille de l'échantillon autorisant une plus forte puissance statistique, ce projet multicentrique permettra l'investigation des effets troupeaux,

en lien avec les différents modes de conduite alimentaire et sanitaire durant cette période physiologique décisive.

Par ailleurs, l'extension de nos travaux à d'autres environnements permettront de confirmer nos résultats, voire de les généraliser. Si tel est le cas, ils pourront contribuer au développement d'interventions ciblées, de stratégies d'élevage et de sélection visant à améliorer la durabilité et la rentabilité des exploitations laitières bovines.

Conclusion générale

Nos travaux ont permis d'investiguer la diversité de la réponse immunitaire des vaches laitières en lien avec leur parcours de vie et leurs performances, au moyen d'une méthode de dosage des cytokines par multiplexage après stimulation *ex vivo* de sang entier. Cette nouvelle approche de phénotypage de la réponse immunitaire innée et adaptative nous a permis de caractériser la diversité intra-individuelle de la réponse immunitaire à l'égard de divers *stimuli*, d'identifier les facteurs liés à cette réponse et d'en explorer la typologie et la variabilité interindividuelle.

La trousse de dosage utilisant la technologie *Luminex*[®] développée par l'UMR IHAP, en partenariat avec Merck Millipore, a montré de bonnes performances pour le dosage de quinze cytokines impliquées dans les voies innée et adaptative de la réponse immunitaire, ainsi que dans le chimiotactisme leucocytaire. L'utilisation de cette méthode de dosage sur des stimulations *ex vivo* de sang total couplée à une PLS-DA *multilevel* a mis en évidence une signature cytokinique propre à chacun des trois *stimuli* bactériens étudiés. Parmi les cytokines dosées, trois étaient suffisantes pour discriminer correctement ces trois *stimuli* : l'IFN- γ , l'IL-1 β et le TNF- α , la première jouant un rôle majeur dans le volet adaptatif de la réponse immunitaire, les deux autres dans son volet inné. Ainsi, nos travaux ont abouti à la validation d'un protocole standardisé permettant d'investiguer la diversité intra- et interindividuelle de la réponse immunitaire cellulaire chez les bovins laitiers.

La mise en relation des concentrations des cytokines, en présence et en l'absence d'un *stimulus*, avec plusieurs indicateurs physiologiques et de santé, et plusieurs index génétiques caractérisant les vaches de notre population d'étude a mis en évidence des interactions complexes entre, d'une part, la compétence immunitaire et, d'autre part, les facteurs génétiques et environnementaux relatifs à la production, la santé mammaire et le statut métabolique. Parmi ces facteurs, le rang de lactation,

les concentrations de BHB du lait, l'index génétique pour les cellules somatiques (INCELL) et la production laitière corrigée par les taux butyreux et protéique (FPCM) étaient fortement associés aux niveaux de sécrétion de plusieurs cytokines. Nos résultats suggèrent l'existence d'une immunosénescence caractérisée par un niveau d'inflammation basal croissant avec l'âge et ce, dès la deuxième lactation. Ce phénomène souligne l'importance de prendre en compte la parité dans les études portant sur l'évaluation de la réponse immunitaire. En cohérence avec d'autres études, nos travaux ont également montré que le déficit énergétique autour du pic de lactation était associé à une hausse des concentrations des cytokines pro-inflammatoires, sans pour autant définir le sens de la causalité. À l'inverse, les vaches ayant des index génétiques élevés pour les cellules somatiques avaient une réponse immunitaire plus modérée, suggérant l'existence de déterminants génétiques communs à l'INCELL et à la compétence immunitaire globale. Ces résultats motivent la mise en place d'investigations plus approfondies des déterminismes génétiques et physiopathologiques liant la résistance aux mammites et la réponse immunitaire. Par ailleurs, nos analyses ont également mis en évidence une association positive entre le FPCM et l'aptitude des vaches à déployer une réponse immunitaire de type 3, réponse adaptée aux *stimuli* bactériens, et à la moduler. Bien que les caractères fonctionnels soient généralement corrélés négativement aux caractères de production, cette association montre que l'amélioration de l'immunocompétence n'est pas nécessairement défavorable aux performances de production. Enfin, l'analyse de la typologie de la réponse immunitaire a mis en évidence une intensité de réponse similaire entre, d'une part, les *stimuli* bactériens et, d'autre part, les ligands TLR. Cette dernière analyse a confirmé l'existence de phénotypes immunitaires variables chez la vache laitière. Toutefois, ces phénotypes, caractérisés par l'intensité de la réponse immunitaire évaluée via les concentrations des cytokines, présentent une certaine constance d'un agent de mammité à l'autre.

La mise en évidence de signatures cytokiniques propres à chaque *stimulus* a montré le potentiel de l'utilisation de la technologie *Luminex*[®] à des fins diagnostiques, notamment dans le cadre des mammites. De même, les analyses de la variabilité interindividuelle de la réponse cytokinique ont mis en avant l'utilité de cette tech-

nologie pour évaluer la compétence immunitaire. Par ailleurs, la mise en œuvre de telles approches de phénotypage, à plusieurs moments au cours du péripartum, permettrait de mieux comprendre certaines facettes de la réponse immunitaire au cours de cette période clé dans la physiologie des vaches laitières. L'analyse de ce type de données complexes représente un réel défi nécessitant de poursuivre les développements méthodologiques. Ces derniers pourraient déboucher sur des interventions ciblées ou des nouvelles stratégies de sélection génétique visant à améliorer la durabilité et la rentabilité des exploitations laitières bovines.

Bibliographie

1. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. World population prospects 2022 : Summary of results. New York : United Nations ; 2022. Report No. : UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3.
2. FAO. **World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2022**. Rome : FAO ; 2022.
3. FAO. FAOSTAT Statistical Database. FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/en/> ; 2023.
4. Contzen S, Häberli I. **Exploring dairy farmers' quality of life perceptions – A Swiss case study**. Journal of Rural Studies. 2021 Dec ;88 :227–38.
5. Ariais PA, Bellouin N, Coppola E, Jones RG, Krinner G, Marotzke J, et al. **Technical Summary**. In : Climate Change 2021 : The Physical Science Basis Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, UK and New York, NY, USA : Cambridge University Press ; 2021. p. 33–144.
6. IPCC, Pachauri RK, Meyer LA. Climate Change 2014 : Synthesis Report. 5th ed. Geneva, Switzerland : IPCC ; 2014.
7. Nisbet EG, Manning MR, Dlugokencky EJ, Fisher RE, Lowry D, Michel SE, et al. **Very Strong Atmospheric Methane Growth in the 4 Years 2014–2017: Implications for the Paris Agreement**. Global Biogeochemical Cycles. 2019 Mar ;33(3) :318–42.
8. FAO. **World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2021**. Rome : FAO ; 2021.
9. Assessment ME. Ecosystems and Human Well-being : Biodiversity Synthesis. Washington, DC : World Resources Institute ; 2005.

10. Morand S. **Emerging diseases, livestock expansion and biodiversity loss are positively related at global scale.** *Biological Conservation*. 2020 Aug;248 :108707.
11. Wardeh M, Risley C, McIntyre MK, Setzkorn C, Baylis M. **Database of host-pathogen and related species interactions, and their global distribution.** *Scientific Data*. 2015 Dec ;2(1) :150049.
12. McDaniel CJ, Cardwell DM, Moeller RB, Gray GC. **Humans and Cattle: A Review of Bovine Zoonoses.** *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2014 Jan;14(1) :1–19.
13. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, et al. **Global trends in antimicrobial use in food animals.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015 May ;112(18) :5649–54.
14. Gilbert W, Thomas LF, Coyne L, Rushton J. **Review: Mitigating the risks posed by intensification in livestock production: The examples of antimicrobial resistance and zoonoses.** *Animal*. 2021 Feb ;15(2) :100123.
15. Barza M. **Potential Mechanisms of Increased Disease in Humans from Antimicrobial Resistance in Food Animals.** *Clinical Infectious Diseases*. 2002 Jun ;34(s3) :S123–5.
16. Phillips I. **Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003 Dec ;53(1) :28–52.
17. Roguet C, Delanoue E, Disenhaus C, Le Cozler Y. Perception de l'élevage par de jeunes adultes en France en 2014. In : *Journées Recherche Porcine*. 2015. p. 227–8.
18. Genet R. Avis de l'Anses relatif au « Bien-être animal : Contexte, définition et Évaluation ». Maisons-Alfort : Anses ; 2018 p. 34. Report No. : 2016-SA-0288.
19. Falconer DS. *Introduction to quantitative genetics*. Pearson Education ; 1996. (Always learning).

20. Miglior F, Fleming A, Malchiodi F, Brito LF, Martin P, Baes CF. **A 100-Year Review: Identification and genetic selection of economically important traits in dairy cattle.** *Journal of Dairy Science.* 2017 Dec;100(12) :10251–71.
21. Felius M, Beerling ML, Buchanan D, Theunissen B, Koolmees P, Lenstra J. **On the History of Cattle Genetic Resources.** *Diversity.* 2014 Nov;6(4) :705–50.
22. Ptak E, Schaeffer LR. **Use of test day yields for genetic evaluation of dairy sires and cows.** *Livestock Production Science.* 1993 Mar;34(1-2) :23–34.
23. Groen AF, Steine T, Colleau JJ, Pedersen J, Pribyl J, Reinsch N. **Economic values in dairy cattle breeding, with special reference to functional traits. Report of an EAAP-working group.** *Livestock Production Science.* 1997 Aug;49(1) :1–21.
24. Cole JB, VanRaden PM. **Symposium review: Possibilities in an age of genomics: The future of selection indices.** *Journal of Dairy Science.* 2018 Apr;101(4) :3686–701.
25. Aguilar I, Misztal I, Johnson DL, Legarra A, Tsuruta S, Lawlor TJ. **Hot topic: A unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score.** *Journal of Dairy Science.* 2010 Feb;93(2) :743–52.
26. Misztal I, Legarra A, Aguilar I. **Computing procedures for genetic evaluation including phenotypic, full pedigree, and genomic information.** *Journal of Dairy Science.* 2009 Sep;92(9) :4648–55.
27. Brito LF, Bedere N, Douhard F, Oliveira HR, Arnal M, Peñagaricano F, et al. **Review: Genetic selection of high-yielding dairy cattle toward sustainable farming systems in a rapidly changing world.** *Animal.* 2021 Dec;15 :100292.
28. Makanjuola BO, Maltecca C, Miglior F, Schenkel FS, Baes CF. **Effect of recent and ancient inbreeding on production and fertility traits in Canadian Holsteins.** *BMC Genomics.* 2020 Dec;21(1) :605.
29. Von Keyserlingk MAG, Martin NP, Kebreab E, Knowlton KF, Grant RJ, Stephenson M, et al. **Invited review: Sustainability of the US dairy industry.** *Journal of Dairy Science.* 2013 Sep;96(9) :5405–25.

30. Rauw WM. **Immune response from a resource allocation perspective.** *Frontiers in Genetics.* 2012 ;3.
31. Rauw WM, Kanis E, Noordhuizen-Stassen EN, Grommers FJ. **Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: A review.** *Livestock Production Science.* 1998 Oct ;56(1) :15–33.
32. Rendel JM. **Correlation between the number of scutellar and abdominal bristles in drosophila melanogaster.** *Genetics.* 1963 Mar ;48(3) :391–408.
33. Berry DP, Friggens NC, Lucy M, Roche JR. **Milk Production and Fertility in Cattle.** *Annual Review of Animal Biosciences.* 2016 Feb ;4(1) :269–90.
34. Royal MD, Flint APF, Woolliams JA. **Genetic and Phenotypic Relationships Among Endocrine and Traditional Fertility Traits and Production Traits in Holstein-Friesian Dairy Cows.** *Journal of Dairy Science.* 2002 Apr ;85(4) :958–67.
35. Bedere N, Cutullic E, Delaby L, Garcia-Launay F, Disenhaus C. **Meta-analysis of the relationships between reproduction, milk yield and body condition score in dairy cows.** *Livestock Science.* 2018 Apr ;210 :73–84.
36. Inchaisri C, Jorritsma R, Vos PLAM, van der Weijden GC, Hogeveen H. **Economic consequences of reproductive performance in dairy cattle.** *Theriogenology.* 2010 Sep ;74(5) :835–46.
37. Norman HD, Wright JR, Hubbard SM, Miller RH, Hutchison JL. **Reproductive status of Holstein and Jersey cows in the United States.** *Journal of Dairy Science.* 2009 Jul ;92(7) :3517–28.
38. Koeck A, Miglior F, Jamrozik J, Kelton DF, Schenkel FS. **Genetic associations of ketosis and displaced abomasum with milk production traits in early first lactation of Canadian Holsteins.** *Journal of Dairy Science.* 2013 Jul ;96(7) :4688–96.
39. Sordillo LM. **Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility.** *Livestock Production Science.* 2005 Dec ;98(1-2) :89–99.

40. Marete A, Sahana G, Fritz S, Lefebvre R, Barbat A, Lund MS, et al. **Genome-wide association study for milking speed in French Holstein cows.** *Journal of Dairy Science.* 2018 Jul;101(7) :6205–19.
41. Liang D, Arnold LM, Stowe CJ, Harmon RJ, Bewley JM. **Estimating US dairy clinical disease costs with a stochastic simulation model.** *Journal of Dairy Science.* 2017 Feb;100(2) :1472–86.
42. Bishop SC, Morris CA. **Genetics of disease resistance in sheep and goats.** *Small Ruminant Research.* 2007 Jun;70(1) :48–59.
43. Schneider DS, Ayres JS. **Two ways to survive infection: What resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases.** *Nature Reviews Immunology.* 2008 Nov;8(11) :889–95.
44. Lyons DT, Freeman AE, Kuck AL. **Genetics of Health Traits in Holstein Cattle.** *Journal of Dairy Science.* 1991 Mar;74(3) :1092–100.
45. Uribe HA, Kennedy BW, Martin SW, Kelton DF. **Genetic Parameters for Common Health Disorders of Holstein Cows.** *Journal of Dairy Science.* 1995 Feb;78(2) :421–30.
46. Van Dorp TE, Dekkers JCM, Martin SW, Noordhuizen JPTM. **Genetic Parameters of Health Disorders, and Relationships with 305-Day Milk Yield and Conformation Traits of Registered Holstein Cows.** *Journal of Dairy Science.* 1998 Aug;81(8) :2264–70.
47. Wilkie B, Mallard B. **Selection for high immune response: An alternative approach to animal health maintenance?** *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 1999 Dec;72(1-2) :231–5.
48. Heringstad B, Klemetsdal G, Ruane J. **Selection for mastitis resistance in dairy cattle: A review with focus on the situation in the Nordic countries.** *Livestock Production Science.* 2000 Jun;64(2-3) :95–106.
49. Hine BC, Mallard BA, Ingham AB, Colditz IG. Immune competence in livestock. In : *Breeding focus 2014 – Resilience.* NSW, Australia : Animal Genetics and Breeding Unit ; 2014. p. 49–64.

50. Hernández A, Quinton VM, Miglior F, Mallard BA. Genetic parameters of dairy cattle immune response traits. In : Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. BeloHorizonte, Brazil ; 2006. p. 15–8.
51. Thompson-Crispi KA, Sewalem A, Miglior F, Mallard BA. **Genetic parameters of adaptive immune response traits in Canadian Holsteins**. Journal of Dairy Science. 2012;95(1) :401–9.
52. Plomin R, DeFries JC, McClearn GE, McClearn GE. Behavioral genetics, a primer. San Francisco : W. H. Freeman ; 1980. (A Series of books in psychology).
53. Toghiani S. **Genetic relationships between production traits and reproductive performance in Holstein dairy cows**. Archives Animal Breeding. 2012 Oct ;55(5) :458–68.
54. Thompson-Crispi KA, Sargolzaei M, Ventura R, Abo-Ismaïl M, Miglior F, Schenkel F, et al. **A genome-wide association study of immune response traits in Canadian Holstein cattle**. BMC Genomics. 2014;15(1) :559.
55. Mallard BA, Emam M, Paibomesai M, Thompson-Crispi K, Wagter-Lesperance L. **Genetic selection of cattle for improved immunity and health**. The Japanese Journal of Veterinary Research. 2015 Feb ;63 Suppl 1 :S37–44.
56. Cobirka M, Tancin V, Slama P. **Epidemiology and Classification of Mastitis**. Animals. 2020 Nov ;10(12) :2212.
57. Campos B, Pickering AC, Rocha LS, Aguilar AP, Fabres-Klein MH, de Oliveira Mendes TA, et al. **Diversity and pathogenesis of Staphylococcus aureus from bovine mastitis: Current understanding and future perspectives**. BMC Veterinary Research. 2022 Dec ;18(1) :115.
58. Raboisson D, Ferchiou A, Pinior B, Gautier T, Sans P, Lhermie G. **The Use of Meta-Analysis for the Measurement of Animal Disease Burden: Losses Due to Clinical Mastitis as an Example**. Frontiers in Veterinary Science. 2020 Mar ;7 :149.

59. Ma Y, Ryan C, Barbano DM, Galton DM, Rudan MA, Boor KJ. **Effects of Somatic Cell Count on Quality and Shelf-Life of Pasteurized Fluid Milk.** *Journal of Dairy Science.* 2000 Feb ;83(2) :264–74.
60. Politis I, Ng-Kwai-Hang KF. **Effects of Somatic Cell Count and Milk Composition on Cheese Composition and Cheese Making Efficiency.** *Journal of Dairy Science.* 1988 Jul ;71(7) :1711–9.
61. Kemp MH, Nolan AM, Cripps PJ, Fitzpatrick JL. **Animal-based measurements of the severity of mastitis in dairy cows.** *Veterinary Record.* 2008 Aug ;163(6) :175–9.
62. Peters MDP, Silveira IDB, Fischer V. **Impact of subclinical and clinical mastitis on sensitivity to pain of dairy cows.** *Animal.* 2015 ;9(12) :2024–8.
63. Garcia SN, Osburn BI, Cullor JS. **A one health perspective on dairy production and dairy food safety.** *One Health.* 2019 Jun ;7 :100086.
64. Firth C, Kremer K, Werner T, Käsbohrer A. **The Effects of Feeding Waste Milk Containing Antimicrobial Residues on Dairy Calf Health.** *Pathogens.* 2021 Jan ;10(2) :112.
65. Treece JM, Morse GE, Levy C. **Lipid Analyses of Bovine Teat Canal Keratin.** *Journal of Dairy Science.* 1966 Oct ;49(10) :1240–4.
66. Capuco AV, Bright SA, Pankey JW, Wood DL, Miller RH, Bitman J. **Increased Susceptibility to Intramammary Infection Following Removal of Teat Canal Keratin.** *Journal of Dairy Science.* 1992 Aug ;75(8) :2126–30.
67. Neijenhuis F, Barkema HW, Hogeveen H, Noordhuizen JPTM. **Relationship Between Teat-End Callosity and Occurrence of Clinical Mastitis.** *Journal of Dairy Science.* 2001 Dec ;84(12) :2664–72.
68. Sordillo LM, Shafer-Weaver K, DeRosa D. **Immunobiology of the Mammary Gland.** *Journal of Dairy Science.* 1997 Aug ;80(8) :1851–65.
69. Mehrzad J, Dosogne H, Meyer E, Heyneman R, Burvenich C. **Respiratory burst activity of blood and milk neutrophils in dairy cows during different stages of lactation.** *Journal of Dairy Research.* 2001 Aug ;68(3) :399–415.

70. Mehrzad J, Duchateau L, Pyörälä S, Burvenich C. **Blood and Milk Neutrophil Chemiluminescence and Viability in Primiparous and Pluriparous Dairy Cows During Late Pregnancy, Around Parturition and Early Lactation.** *Journal of Dairy Science.* 2002 Dec ;85(12) :3268–76.
71. Schukken YH, Vanvliet J, Vandegheer D, Grommers FJ. **A Randomized Blind Trial on Dry Cow Antibiotic Infusion in a Low Somatic Cell Count Herd.** *Journal of Dairy Science.* 1993 Oct ;76(10) :2925–30.
72. Welty FK, Larry Smith K, Schanbacher FL. **Lactoferrin Concentration During Involution of the Bovine Mammary Gland.** *Journal of Dairy Science.* 1976 Feb ;59(2) :224–31.
73. Schukken YH, Grommers FJ, Van De Geer D, Erb HN, Brand A. **Risk Factors for Clinical Mastitis in Herds with a Low Bulk Milk Somatic Cell Count. 2. Risk Factors for Escherichia coli and Staphylococcus aureus.** *Journal of Dairy Science.* 1991 Mar ;74(3) :826–32.
74. Grinberg N, Elazar S, Rosenshine I, Shpigel NY. **β -Hydroxybutyrate Abrogates Formation of Bovine Neutrophil Extracellular Traps and Bactericidal Activity against Mammary Pathogenic Escherichia Coli.** *Infection and Immunity.* 2008 Jun ;76(6) :2802–7.
75. Dingwell RT, Leslie KE, Schukken YH, Sargeant JM, Timms LL, Duffield TF, et al. **Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period.** *Preventive Veterinary Medicine.* 2004 Apr ;63(1-2) :75–89.
76. Bradley AJ, Green MJ. **The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention.** 2004 ;22.
77. Maurić Maljković M, Vlahek I, Piplica A, Ekert Kabalin A, Sušić V, Stevanović V. **Prospects of toll-like receptors in dairy cattle breeding.** *Animal Genetics.* 2023 Aug ;54(4) :425–34.
78. Bhattarai D, Worku T, Dad R, Rehman ZU, Gong X, Zhang S. **Mechanism of pattern recognition receptors (PRRs) and host pathogen interplay in bovine mastitis.** *Microbial Pathogenesis.* 2018 Jul ;120 :64–70.

79. Fisher CA, Bhattarai EK, Osterstock JB, Dowd SE, Seabury PM, Vikram M, et al. **Evolution of the Bovine TLR Gene Family and Member Associations with Mycobacterium avium Subspecies Paratuberculosis Infection**. Chakravorty D, editor. PLoS ONE. 2011 Nov;6(11) :e27744.
80. Kielian T, editor. **Toll-like receptors : Roles in infection and neuropathology**. Berlin ; New York : Springer Verlag ; 2009. (Current topics in microbiology and immunology).
81. Vander Ley BL. **Current concepts in dairy cattle immunology**. American Association of Bovine Practitioners Conference Proceedings. 2016 Sep;86–8.
82. Werling D, Hope JC, Howard CJ, Jungi TW. **Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists**. Immunology. 2004 Jan;111(1) :41–52.
83. Griebel PJ, Brownlie R, Manuja A, Nichani A, Mookherjee N, Popowich Y, et al. **Bovine toll-like receptor 9: A comparative analysis of molecular structure, function and expression**. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2005 Oct;108(1-2) :11–6.
84. Turner ML, Cronin JG, Healey GD, Sheldon IM. **Epithelial and Stromal Cells of Bovine Endometrium Have Roles in Innate Immunity and Initiate Inflammatory Responses to Bacterial Lipopeptides In Vitro via Toll-Like Receptors TLR2, TLR1, and TLR6**. Endocrinology. 2014 Apr;155(4) :1453–65.
85. Liu Q, Ding JL. **The molecular mechanisms of TLR-signaling cooperation in cytokine regulation**. Immunology & Cell Biology. 2016 Jul;94(6) :538–42.
86. Conejeros I, Gibson AJ, Werling D, Muñoz-Caro T, Hermosilla C, Taubert A, et al. **Effect of the synthetic Toll-like receptor ligands LPS, Pam3CSK4, HKLM and FSL-1 in the function of bovine polymorphonuclear neutrophils**. Developmental & Comparative Immunology. 2015 Oct;52(2) :215–25.

87. Lotz S, Aga E, Wilde I, Van Zandbergen G, Hartung T, Solbach W, et al. **Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2.** *Journal of Leukocyte Biology.* 2004 Mar;75(3) :467–77.
88. Schenk M, Belisle JT, Modlin RL. **TLR2 Looks at Lipoproteins.** *Immunity.* 2009 Dec;31(6) :847–9.
89. Nguyen MT, Matsuo M, Niemann S, Herrmann M, Götz F. **Lipoproteins in Gram-Positive Bacteria: Abundance, Function, Fitness.** *Frontiers in Microbiology.* 2020 ;11 :582582.
90. Percy MG, Gründling A. **Lipoteichoic Acid Synthesis and Function in Gram-Positive Bacteria.** *Annual Review of Microbiology.* 2014 Sep ;68(1) :81–100.
91. Rose WA, McGowin CL, Pyles RB. **FSL-1, a bacterial-derived toll-like receptor 2/6 agonist, enhances resistance to experimental HSV-2 infection.** *Virology Journal.* 2009 Dec ;6(1) :195.
92. Jin MS, Lee JO. **Structures of the Toll-like Receptor Family and Its Ligand Complexes.** *Immunity.* 2008 Aug ;29(2) :182–91.
93. Wassef A, Janardhan K, Pearce JW, Singh B. **Toll-like receptor 4 in normal and inflamed lungs and other organs of pig, dog and cattle.** *Histology and Histopathology.* 2004 Oct ;(19) :1201–8.
94. Werling D, Hope JC, Siddiqui N, Widdison S, Russell C, Sopp P, et al. **Subset-Specific Expression of Toll-Like Receptors by Bovine Afferent Lymph Dendritic Cells.** *Frontiers in Veterinary Science.* 2017 Apr ;4.
95. Sauter KS, Brcic M, Franchini M, Jungi TW. **Stable transduction of bovine TLR4 and bovine MD-2 into LPS-nonresponsive cells and soluble CD14 promote the ability to respond to LPS.** *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2007 Jul ;118(1-2) :92–104.
96. Petes C, Odoardi N, Gee K. **The Toll for Trafficking: Toll-Like Receptor 7 Delivery to the Endosome.** *Frontiers in Immunology.* 2017 Sep ;8 :1075.

97. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, et al. **Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004 Apr;101(15) :5598–603.
98. Gordon KB, Gorski KS, Gibson SJ, Kedl RM, Kieper WC, Qiu X, et al. **Synthetic TLR Agonists Reveal Functional Differences between Human TLR7 and TLR8.** The Journal of Immunology. 2005 Feb;174(3) :1259–68.
99. Ma F, Zhang J, Zhang J, Zhang C. **The TLR7 agonists imiquimod and gardiquimod improve DC-based immunotherapy for melanoma in mice.** Cellular & Molecular Immunology. 2010 Sep;7(5) :381–8.
100. Barut GT, Lischer HEL, Bruggmann R, Summerfield A, Talker SC. **Transcriptomic profiling of bovine blood dendritic cells and monocytes following TLR stimulation.** European Journal of Immunology. 2020;50(11) :1691–711.
101. Green NM, Laws A, Kiefer K, Busconi L, Kim YM, Brinkmann MM, et al. **Murine B Cell Response to TLR7 Ligands Depends on an IFN- β Feedback Loop.** The Journal of Immunology. 2009 Aug;183(3) :1569–76.
102. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, et al. **Expression and Function of Toll-Like Receptors in Eosinophils: Activation by Toll-Like Receptor 7 Ligand.** The Journal of Immunology. 2003 Oct;171(8) :3977–82.
103. Dinarello CA. **Historical insights into cytokines.** European Journal of Immunology. 2007 Nov;37(S1) :S34–45.
104. Stow JL, Ching Low P, Offenhäuser C, Sangermani D. **Cytokine secretion in macrophages and other cells: Pathways and mediators.** Immunobiology. 2009 Jul;214(7) :601–12.
105. Hughes CE, Nibbs RJB. **A guide to chemokines and their receptors.** The FEBS Journal. 2018 Aug;285(16) :2944–71.
106. Stanley AC, Lacy P. **Pathways for Cytokine Secretion.** Physiology. 2010 Aug;25(4) :218–29.

107. Cavalli G, Colafrancesco S, Emmi G, Imazio M, Lopalco G, Maggio MC, et al. **Interleukin 1 α : A comprehensive review on the role of IL-1 α in the pathogenesis and treatment of autoimmune and inflammatory diseases.** *Autoimmunity Reviews*. 2021 Mar;20(3) :102763.
108. Lopez-Castejon G, Brough D. **Understanding the mechanism of IL-1 β secretion.** *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2011 Aug;22(4) :189–95.
109. Arend WP. **Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms.** *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2000 Nov;59(90001) :60i–64.
110. Trinschek B, Lüssi F, Haas J, Wildemann B, Zipp F, Wiendl H, et al. **Kinetics of IL-6 Production Defines T Effector Cell Responsiveness to Regulatory T Cells in Multiple Sclerosis.** Su X, editor. *PLoS ONE*. 2013 Oct;8(10) :e77634.
111. Dienz O, Rincon M. **The effects of IL-6 on CD4 T cell responses.** *Clinical Immunology*. 2009 Jan;130(1) :27–33.
112. Chi L, Li Y, Stehno-Bittel L, Gao J, Morrison DC, Stechschulte DJ, et al. **Interleukin-6 Production by Endothelial Cells via Stimulation of Protease-Activated Receptors Is Amplified by Endotoxin and Tumor Necrosis Factor- α .** *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2001 Apr;21(4) :231–40.
113. Saco Y, Bassols A. **Acute phase proteins in cattle and swine: A review.** *Veterinary Clinical Pathology*. 2023 Feb;52(S1) :50–63.
114. Cartmell T, Poole S, Turnbull AV, Rothwell NJ, Luheshi GN. **Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats.** *The Journal of Physiology*. 2000 Aug;526(3) :653–61.
115. Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, Zou Z, Sun PD. **Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1.** *Journal of Leukocyte Biology*. 2012 Feb;91(2) :299–309.
116. Mehta AK, Gracias DT, Croft M. **TNF activity and T cells.** *Cytokine*. 2018 Jan;101 :14–8.

117. Sorimachi K, Akimoto K, Hattori Y, Ieiri T, Niwa A. **Activation of macrophages by lactoferrin: Secretion of TNF- α , IL-8 and NO.** *IUBMB Life*. 1997 Sep;43(1) :79–87.
118. Parameswaran N, Patial S. **Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages.** *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. 2010 ;20(2) :87–103.
119. Pober JS. **Endothelial activation: Intracellular signaling pathways.** *Arthritis Research*. 2002;4 Suppl 3(Suppl 3) :S109–116.
120. Hwang ES, Hong JH, Glimcher LH. **IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508.** *The Journal of Experimental Medicine*. 2005 Nov;202(9) :1289–300.
121. Nelson BH, Lord JD, Greenberg PD. **Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor β and γ chains mediate the signal for T-cell proliferation.** *Nature*. 1994 May;369(6478) :333–6.
122. Silva-Filho JL, Caruso-Neves C, Pinheiro AAS. **IL-4: An important cytokine in determining the fate of T cells.** *Biophysical Reviews*. 2014 Mar ;6(1) :111–8.
123. Couper KN, Blount DG, Riley EM. **IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection.** *The Journal of Immunology*. 2008 May;180(9) :5771–7.
124. Billiau A, Matthys P. **Interferon- γ : A historical perspective.** *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2009 Apr;20(2) :97–113.
125. Zenobia C, Hajishengallis G. **Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation.** *Periodontology 2000*. 2015 Oct;69(1) :142–59.
126. Lin Z, Shi JL, Chen M, Zheng ZM, Li MQ, Shao J. **CCL2: An important cytokine in normal and pathological pregnancies: A review.** *Frontiers in Immunology*. 2023 Jan ;13 :1053457.
127. Bhavsar I, Miller CS, Al-Sabbagh M. **Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha (MIP-1 alpha)/CCL3: As a Biomarker.** In : Preedy VR, Patel VB, editors. *General Methods in Biomarker Research and their Applications*. Dordrecht : Springer Netherlands ; 2015. p. 223–49.

128. Zhu XB, Wang YB, Chen O, Zhang DQ, Zhang ZH, Cao AH, et al. **Characterization of the expression of macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) and C-C chemokine receptor 5 (CCR5) after kainic acid-induced status epilepticus (SE) in juvenile rats: MIP-1 α and CCR5 in juvenile rat hippocampus.** *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2012 Oct ;38(6) :602–16.
129. Sindhu, Kochumon, Shenouda, Wilson, Al-Mulla, Ahmad. **The Cooperative Induction of CCL4 in Human Monocytic Cells by TNF- α and Palmitate Requires MyD88 and Involves MAPK/NF- κ B Signaling Pathways.** *International Journal of Molecular Sciences*. 2019 Sep ;20(18) :4658.
130. Zhu M, Allard JS, Zhang Y, Perez E, Spangler EL, Becker KG, et al. **Age-Related Brain Expression and Regulation of the Chemokine CCL4/MIP-1 β in APP/PS1 Double-Transgenic Mice:** *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2014 Apr ;73(4) :362–74.
131. Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. **The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases.** *Expert Review of Clinical Immunology*. 2014 May ;10(5) :593–619.
132. Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO, et al. **CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications.** *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2011 Jul ;S1359610111000293.
133. Murphy K, Weaver C. *Janeway's immunobiology*. 9th edition. New York, NY : Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC ; 2016.
134. Zhu J, Yamane H, Paul WE. **Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations.** *Annual Review of Immunology*. 2010 Mar ;28(1) :445–89.
135. Annunziato F, Romagnani C, Romagnani S. **The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015 Mar ;135(3) :626–35.
136. Baumgart M, Moos V, Schuhbauer D, Müller B. **Differential expression of major histocompatibility complex class II genes on murine macrophages associated with T cell cytokine profile and protective/suppressive effects.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998 Jun ;95(12) :6936–40.

137. Smith SM, Dockrell HM. **Role of CD8⁺ T cells in mycobacterial infections.** *Immunology & Cell Biology.* 2000 Aug;78(4) :325–33.
138. Ma X, Yan W, Zheng H, Du Q, Zhang L, Ban Y, et al. **Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells.** *F1000Research.* 2015 Dec;4 :1465.
139. Trinchieri G. **Interleukin-12: A cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes.** *Blood.* 1994 Dec;84(12) :4008–27.
140. Borriello F, Galdiero M, Varricchi G, Loffredo S, Spadaro G, Marone G. **Innate Immune Modulation by GM-CSF and IL-3 in Health and Disease.** *International Journal of Molecular Sciences.* 2019 Feb;20(4) :834.
141. Hamilton JA. **GM-CSF in inflammation.** *Journal of Experimental Medicine.* 2020 Jan;217(1) :e20190945.
142. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. **Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview.** *Journal of Interferon & Cytokine Research.* 2009 Jun;29(6) :313–26.
143. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. **Monocyte and macrophage differentiation: Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases.** *Biomarker Research.* 2014 Jan;2(1) :1.
144. Flynn JL, Chan J, Lin PL. **Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis.** *Mucosal Immunology.* 2011 May;4(3) :271–8.
145. Hilligan KL, Ronchese F. **Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4⁺ T helper cell responses.** *Cellular & Molecular Immunology.* 2020 Jun;17(6) :587–99.
146. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. **Selective Expression of the Eotaxin Receptor CCR3 by Human T Helper 2 Cells.** *Science.* 1997 Sep;277(5334) :2005–7.

147. Hirst SJ, Hallsworth MP, Peng Q, Lee TH. **Selective Induction of Eotaxin Release by Interleukin-13 or Interleukin-4 in Human Airway Smooth Muscle Cells Is Synergistic with Interleukin-1 β and Is Mediated by the Interleukin-4 Receptor α -Chain.** American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2002 Apr ;165(8) :1161–71.
148. Provost V, Larose MC, Langlois A, Rola-Pleszczynski M, Flamand N, Laviolette M. **CCL26/eotaxin-3 is more effective to induce the migration of eosinophils of asthmatics than CCL11/eotaxin-1 and CCL24/eotaxin-2.** Journal of Leukocyte Biology. 2013 Mar ;94(2) :213–22.
149. Ugucioni M, Mackay CR, Ochensberger B, Loetscher P, Rhis S, LaRosa GJ, et al. **High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines.** Journal of Clinical Investigation. 1997 Sep ;100(5) :1137–43.
150. Motran CC, Silvane L, Chiapello LS, Theumer MG, Ambrosio LF, Volpini X, et al. **Helminth Infections: Recognition and Modulation of the Immune Response by Innate Immune Cells.** Frontiers in Immunology. 2018 Apr ;9 :664.
151. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. **IgE, mast cells, basophils, and eosinophils.** Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2010 Feb ;125(2) :S73–80.
152. Finkelman FD, Wynn TA, Donaldson DD, Urban JF. **The role of IL-13 in helminth-induced inflammation and protective immunity against nematode infections.** Current Opinion in Immunology. 1999 Aug ;11(4) :420–6.
153. Zhao A, McDermott J, Urban JF, Gause W, Madden KB, Yeung KA, et al. **Dependence of IL-4, IL-13, and Nematode-Induced Alterations in Murine Small Intestinal Smooth Muscle Contractility on Stat6 and Enteric Nerves.** The Journal of Immunology. 2003 Jul ;171(2) :948–54.
154. Zhang MZ, Wang X, Wang Y, Niu A, Wang S, Zou C, et al. **IL-4/IL-13-mediated polarization of renal macrophages/dendritic cells to an M2a phenotype is essential for recovery from acute kidney injury.** Kidney International. 2017 Feb ;91(2) :375–86.

155. Cheng H, Guan X, Chen D, Ma W. **The Th17/Treg Cell Balance: A Gut Microbiota-Modulated Story**. *Microorganisms*. 2019 Nov;7(12) :583.
156. Blaschitz C, Raffatellu M. **Th17 Cytokines and the Gut Mucosal Barrier**. *Journal of Clinical Immunology*. 2010 Mar;30(2) :196–203.
157. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. **Induction and effector functions of TH17 cells**. *Nature*. 2008 Jun;453(7198) :1051–7.
158. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. **TGF β in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells**. *Immunity*. 2006 Feb;24(2) :179–89.
159. Qu N, Xu M, Mizoguchi I, Furusawa J, Kaneko K, Watanabe K, et al. **Pivotal Roles of T-Helper 17-Related Cytokines, IL-17, IL-22, and IL-23, in Inflammatory Diseases**. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013 Jul;2013 :1–13.
160. Cavagnero KJ, Gallo RL. **Essential immune functions of fibroblasts in innate host defense**. *Frontiers in Immunology*. 2022 Dec;13 :1058862.
161. Valeri M, Raffatellu M. **Cytokines IL-17 and IL-22 in the host response to infection**. Napier B, editor. *Pathogens and Disease*. 2016 Dec;74(9) :ftw111.
162. Shaheen M, Tantary H, Nabi S. **A Treatise on Bovine Mastitis: Disease and Disease Economics, Etiological Basis, Risk Factors, Impact on Human Health, Therapeutic Management, Prevention and Control Strategy**. *Advances in Dairy Research*. 2015 ;04(01).
163. Cheng WN, Han SG. **Bovine mastitis: Risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review**. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2020 Nov;33(11) :1699–713.
164. Tomazi T, De Souza Filho AF, Heinemann MB, Santos MVD. **Molecular characterization and antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus agalactiae* isolated from clinical mastitis in dairy cattle**. Loo JJ, editor. *PLOS ONE*. 2018 Jun;13(6) :e0199561.

165. Putz EJ, Palmer MV, Ma H, Casas E, Reinhardt TA, Lippolis JD. **Case report: Characterization of a persistent, treatment-resistant, novel *Staphylococcus aureus* infection causing chronic mastitis in a Holstein dairy cow.** BMC Veterinary Research. 2020 Dec;16(1) :336.
166. Smistad M, Kaspersen H, Franklin-Alming FV, Wolff C, Sølverød L, Porcellato D, et al. ***Streptococcus dysgalactiae* ssp. *Dysgalactiae* in Norwegian bovine dairy herds: Risk factors, sources, and genomic diversity.** Journal of Dairy Science. 2022 Apr;105(4) :3574–87.
167. Sherwin VE, Egan SA, Green MJ, Leigh JA. **Survival of *Streptococcus uberis* on bedding substrates.** The Veterinary Journal. 2021 Oct;276 :105731.
168. Wang L, Mankin KR, Marchin GL. **SURVIVAL OF FECAL BACTERIA IN DAIRY COW MANURE.** Transactions of the ASAE. 2004;47(4) :1239–46.
169. Keane OM. **Symposium review: Intramammary infections—Major pathogens and strain-associated complexity.** Journal of Dairy Science. 2019 May;102(5) :4713–26.
170. Zadoks RN, Gillespie BE, Barkema HW, Sampimon OC, Oliver SP, Schukken YH. **Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus Uberis* infections in dairy herds.** Epidemiology and Infection. 2003 Apr;130(2) :335–49.
171. Davies PL, Leigh JA, Bradley AJ, Archer SC, Emes RD, Green MJ. **Molecular Epidemiology of *Streptococcus uberis* Clinical Mastitis in Dairy Herds: Strain Heterogeneity and Transmission.** Fenwick BW, editor. Journal of Clinical Microbiology. 2016 Jan;54(1) :68–74.
172. Passey S, Bradley A, Mellor H. ***Escherichia coli* isolated from bovine mastitis invade mammary cells by a modified endocytic pathway.** Veterinary Microbiology. 2008 Jul;130(1-2) :151–64.
173. Dogan B, Klaessig S, Rishniw M, Almeida RA, Oliver SP, Simpson K, et al. **Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis.** Veterinary Microbiology. 2006 Sep;116(4) :270–82.

174. Almeida RA, Dogan B, Klaessing S, Schukken YH, Oliver SP. **Intracellular fate of strains of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with acute or chronic mastitis.** *Veterinary Research Communications*. 2011 Feb ;35(2) :89–101.
175. Bradley AJ, Green MJ. **Adaptation of *Escherichia Coli* to the Bovine Mammary Gland.** *Journal of Clinical Microbiology*. 2001 May ;39(5) :1845–9.
176. Sommerhäuser J, Kloppert B, Wolter W, Zschöck M, Sobiraj A, Failing K. **The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme.** *Veterinary Microbiology*. 2003 Oct ;96(1) :91–102.
177. Kornalijnslijper JE, Daemen AJJM, Van Werven T, Niewold TA, Rutten VPMG, Noordhuizen-Stassen EN. **Bacterial growth during the early phase of infection determines the severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in dairy cows.** *Veterinary Microbiology*. 2004 Jul ;101(3) :177–86.
178. Reyher KK, Dohoo IR, Scholl DT, Keefe GP. **Evaluation of minor pathogen intramammary infection, susceptibility parameters, and somatic cell counts on the development of new intramammary infections with major mastitis pathogens.** *Journal of Dairy Science*. 2012 Jul ;95(7) :3766–80.
179. Dalanezi FM, Joaquim SF, Guimarães FF, Guerra ST, Lopes BC, Schmidt EMS, et al. **Influence of pathogens causing clinical mastitis on reproductive variables of dairy cows.** *Journal of Dairy Science*. 2020 Apr ;103(4) :3648–55.
180. Newton HT, Green MJ, Benchaoui H, Cracknell V, Rowan T, Bradley AJ. **Comparison of the efficacy of cloxacillin alone and cloxacillin combined with an internal teat sealant for dry-cow therapy.** *Veterinary Record*. 2008 May ;162(21) :678–83.
181. Bradley AJ, Breen JE, Payne B, Williams P, Green MJ. **The use of a cephalonium containing dry cow therapy and an internal teat sealant, both alone and in combination.** *Journal of Dairy Science*. 2010 Apr ;93(4) :1566–77.
182. Bradley AJ, Breen JE, Payne B, Green MJ. **A comparison of broad-spectrum and narrow-spectrum dry cow therapy used alone and in combination with a teat sealant.** *Journal of Dairy Science*. 2011 Feb ;94(2) :692–704.

183. Bradley AJ, Green MJ. *A Study of the Incidence and Significance of Intramammary Enterobacterial Infections Acquired During the Dry Period*. Journal of Dairy Science. 2000 Sep;83(9) :1957–65.
184. Bradley AJ, Green MJ. *An Investigation of the Impact of Intramammary Antibiotic Dry Cow Therapy on Clinical Coliform Mastitis*. Journal of Dairy Science. 2001 Jul;84(7) :1632–9.
185. Huxley JN, Green MJ, Green LE, Bradley AJ. *Evaluation of the Efficacy of an Internal Teat Sealer During the Dry Period*. Journal of Dairy Science. 2002 Mar;85(3) :551–61.
186. Sanford CJ, Keefe GP, Dohoo IR, Leslie KE, Dingwell RT, DesCôteaux L, et al. *Efficacy of using an internal teat sealer to prevent new intramammary infections in nonlactating dairy cattle*. Journal of the American Veterinary Medical Association. 2006 May;228(10) :1565–73.
187. Pantoja JCF, Correia LBN, Rossi RS, Latosinski GS. *Association between teat-end hyperkeratosis and mastitis in dairy cows: A systematic review*. Journal of Dairy Science. 2020 Feb;103(2) :1843–55.
188. Breen JE, Green MJ, Bradley AJ. *Quarter and cow risk factors associated with the occurrence of clinical mastitis in dairy cows in the United Kingdom*. Journal of Dairy Science. 2009 Jun;92(6) :2551–61.
189. Wilson DJ, Grohn YT, Bennett GJ, González RN, Schukken YH, Spatz J. *Comparison of J5 Vaccinates and Controls for Incidence, Etiologic Agent, Clinical Severity, and Survival in the Herd Following Naturally Occurring Cases of Clinical Mastitis*. Journal of Dairy Science. 2007 Sep;90(9) :4282–8.
190. Weiss WP, Hogan JS, Smith KL, Hoblet KH. *Relationships Among Selenium, Vitamin E, and Mammary Gland Health in Commercial Dairy Herds*. Journal of Dairy Science. 1990 Feb;73(2) :381–90.
191. Ceballos-Marquez A, Barkema HW, Stryhn H, Wichtel JJ, Neumann J, Mella A, et al. *The effect of selenium supplementation before calving on early-lactation udder health in pastured dairy heifers*. Journal of Dairy Science. 2010 Oct;93(10) :4602–12.

192. Wheelock JB, Rhoads RP, VanBaale MJ, Sanders SR, Baumgard LH. **Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows.** *Journal of Dairy Science.* 2010 Feb ;93(2) :644–55.
193. do Amaral BC, Connor EE, Tao S, Hayen MJ, Bubolz JW, Dahl GE. **Heat stress abatement during the dry period influences metabolic gene expression and improves immune status in the transition period of dairy cows.** *Journal of Dairy Science.* 2011 Jan ;94(1) :86–96.
194. Cook NB, Mentink RL, Bennett TB, Burgi K. **The Effect of Heat Stress and Lameness on Time Budgets of Lactating Dairy Cows.** *Journal of Dairy Science.* 2007 Apr ;90(4) :1674–82.
195. Santman-Berends IMG, Hage JJ, Lam TJGM, Sampimon OC, van Schaik G. **The effect of bluetongue virus serotype 8 on milk production and somatic cell count in Dutch dairy cows in 2008.** *Journal of Dairy Science.* 2011 Mar ;94(3) :1347–54.
196. Berends IMG, Swart WAJM, Frankena K, Muskens J, Lam TJGM, van Schaik G. **The effect of becoming BVDV-free on fertility and udder health in Dutch dairy herds.** *Preventive Veterinary Medicine.* 2008 Apr ;84(1-2) :48–60.
197. Windig JJ, Ouweltjes W, ten Napel J, de Jong G, Veerkamp RF, De Haas Y. **Combining somatic cell count traits for optimal selection against mastitis.** *Journal of Dairy Science.* 2010 Apr ;93(4) :1690–701.
198. de Haas Y, de Jong G, ten Napel J, Ouweltjes W, Sampimon OC, Veerkamp RF, et al. Udder health and breeding. In : European boom in AMS and new tools in mastitis prevention. 2008.
199. LeBlanc SJ, Lissemore KD, Kelton DF, Duffield TF, Leslie KE. **Major Advances in Disease Prevention in Dairy Cattle.** *Journal of Dairy Science.* 2006 Apr ;89(4) :1267–79.
200. Horst EA, Kvidera SK, Baumgard LH. **Invited review: The influence of immune activation on transition cow health and performance—A critical evaluation of traditional dogmas.** *Journal of Dairy Science.* 2021 Aug ;104(8) :8380–410.

201. Drackley JK. **Biology of Dairy Cows During the Transition Period: The Final Frontier?** Journal of Dairy Science. 1999 Nov;82(11) :2259–73.
202. Coffey MP, Simm G, Brotherstone S. **Energy Balance Profiles for the First Three Lactations of Dairy Cows Estimated Using Random Regression.** Journal of Dairy Science. 2002 Oct;85(10) :2669–78.
203. Moallem U, Folman Y, Sklan D. **Effects of Somatotropin and Dietary Calcium Soaps of Fatty Acids in Early Lactation on Milk Production, Dry Matter Intake, and Energy Balance of High-yielding Dairy Cows.** Journal of Dairy Science. 2000 Sep;83(9) :2085–94.
204. Berge AC, Vertenten G. **A field study to determine the prevalence, dairy herd management systems, and fresh cow clinical conditions associated with ketosis in western European dairy herds.** Journal of Dairy Science. 2014 Apr;97(4) :2145–54.
205. Cameron REB, Dyk PB, Herdt TH, Kaneene JB, Miller R, Bucholtz HF, et al. **Dry Cow Diet, Management, and Energy Balance as Risk Factors for Displaced Abomasum in High Producing Dairy Herds.** Journal of Dairy Science. 1998 Jan;81(1) :132–9.
206. Curtis CR, Erb HN, Sniffen CJ, Smith RD, Powers PA, Smith MC, et al. **Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows.** Journal of the American Veterinary Medical Association. 1983 Sep;183(5) :559–61.
207. Dohoo IR, Martin SW. **Subclinical ketosis: Prevalence and associations with production and disease.** Canadian Journal of Comparative Medicine : Revue Canadienne De Medecine Comparee. 1984 Jan;48(1) :1–5.
208. Duffield T. **Subclinical ketosis in lactating dairy cattle.** The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice. 2000 Jul;16(2) :231–53, v.
209. Duffield TF, Lissemore KD, McBride BW, Leslie KE. **Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production.** Journal of Dairy Science. 2009 Feb;92(2) :571–80.

210. Geishauser T, Leslie K, Duffield T, Edge V. **An Evaluation of Milk Ketone Tests for the Prediction of Left Displaced Abomasum in Dairy Cows.** *Journal of Dairy Science.* 1997 Dec;80(12) :3188–92.
211. Goff JP, Horst RL. **Physiological Changes at Parturition and Their Relationship to Metabolic Disorders.** *Journal of Dairy Science.* 1997 Jul;80(7) :1260–8.
212. Kaneene JB, Miller R, Herdt TH, Gardiner JC. **The association of serum nonesterified fatty acids and cholesterol, management and feeding practices with peripartum disease in dairy cows.** *Preventive Veterinary Medicine.* 1997 Jul;31(1-2) :59–72.
213. LeBlanc S. **Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period.** *The Journal of Reproduction and Development.* 2010 Jan ;56 Suppl :S29–35.
214. Markusfeld O. **Periparturient Traits in Seven High Dairy Herds. Incidence Rates, Association with Parity, and Interrelationships Among Traits.** *Journal of Dairy Science.* 1987 Jan;70(1) :158–66.
215. Kehrli ME, Nonnecke BJ, Roth JA. **Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period.** *American Journal of Veterinary Research.* 1989 Feb ;50(2) :207–14.
216. Lacetera N, Scalia D, Bernabucci U, Ronchi B, Pirazzi D, Nardone A. **Lymphocyte Functions in Overconditioned Cows Around Parturition.** *Journal of Dairy Science.* 2005 Jun;88(6) :2010–6.
217. Mallard BA, Dekkers JC, Ireland MJ, Leslie KE, Sharif S, Lacey Vankampen C, et al. **Alteration in Immune Responsiveness During the Peripartum Period and Its Ramification on Dairy Cow and Calf Health.** *Journal of Dairy Science.* 1998 Feb ;81(2) :585–95.
218. Trevisi E, Minuti A. **Assessment of the innate immune response in the periparturient cow.** *Research in Veterinary Science.* 2018 Feb ;116 :47–54.
219. Hoeben D, Heyneman R, Burvenich C. **Elevated levels of β -hydroxybutyric acid in periparturient cows and in vitro effect on respiratory burst activity of bovine neutrophils.** *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 1997 Sep;58(2) :165–70.

220. Scalia D, Lacetera N, Bernabucci U, Demeyere K, Duchateau L, Burvenich C. **In Vitro Effects of Nonesterified Fatty Acids on Bovine Neutrophils Oxidative Burst and Viability.** Journal of Dairy Science. 2006 Jan ;89(1) :147–54.
221. Ster C, Loiseau M-C, Lacasse P. **Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells.** Journal of Dairy Science. 2012 Feb ;95(2) :708–17.
222. Lacetera N, Scalia D, Franci O, Bernabucci U, Ronchi B, Nardone A. **Short Communication: Effects of Nonesterified Fatty Acids on Lymphocyte Function in Dairy Heifers.** Journal of Dairy Science. 2004 Apr ;87(4) :1012–4.
223. Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL. **Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders.** Veterinary Immunology and Immunopathology. 2006 Sep ;113(1-2) :21–9.
224. Suriyasathaporn W, Daemen AJJM, Noordhuizen-Stassen EN, Dieleman SJ, Nielen M, Schukken YH. **β -hydroxybutyrate levels in peripheral blood and ketone bodies supplemented in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes.** Veterinary Immunology and Immunopathology. 1999 May ;68(2-4) :177–86.
225. Chapinal N, Carson M, Duffield TF, Capel M, Godden S, Overton M, et al. **The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period.** Journal of Dairy Science. 2011 Oct ;94(10) :4897–903.
226. Chapinal N, LeBlanc SJ, Carson ME, Leslie KE, Godden S, Capel M, et al. **Herd-level association of serum metabolites in the transition period with disease, milk production, and early lactation reproductive performance.** Journal of Dairy Science. 2012 Oct ;95(10) :5676–82.
227. DeGaris PJ, Lean IJ. **Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles.** The Veterinary Journal. 2008 Apr ;176(1) :58–69.
228. Goff JP. **The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows.** The Veterinary Journal. 2008 Apr ;176(1) :50–7.

229. Huzzey JM, Nydam DV, Grant RJ, Overton TR. Associations of prepartum plasma cortisol, haptoglobin, fecal cortisol metabolites, and nonesterified fatty acids with postpartum health status in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2011 Dec;94(12) :5878–89.
230. LeBlanc SJ, Leslie KE, Duffield TF. Metabolic Predictors of Displaced Abomasum in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*. 2005 Jan ;88(1) :159–70.
231. Martinez N, Risco CA, Lima FS, Bisinotto RS, Greco LF, Ribeiro ES, et al. Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *Journal of Dairy Science*. 2012 Dec;95(12) :7158–72.
232. Neves RC, Leno BM, Bach KD, McArt JAA. Epidemiology of subclinical hypocalcemia in early-lactation Holstein dairy cows: The temporal associations of plasma calcium concentration in the first 4 days in milk with disease and milk production. *Journal of Dairy Science*. 2018 Oct;101(10) :9321–31.
233. Neves RC, Leno BM, Curler MD, Thomas MJ, Overton TR, McArt JAA. Association of immediate postpartum plasma calcium concentration with early-lactation clinical diseases, culling, reproduction, and milk production in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 2018 Jan ;101(1) :547–55.
234. Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR. Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *Journal of Dairy Science*. 2010 Feb ;93(2) :546–54.
235. Quiroz-Rocha GF, LeBlanc S, Duffield T, Wood D, Leslie KE, Jacobs RM. Evaluation of prepartum serum cholesterol and fatty acids concentrations as predictors of postpartum retention of the placenta in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2009 Mar ;234(6) :790–3.
236. Ribeiro ES, Lima FS, Greco LF, Bisinotto RS, Monteiro APA, Favoreto M, et al. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. *Journal of Dairy Science*. 2013 Sep ;96(9) :5682–97.

237. Abdelli A, Raboisson D, Kaidi R, Ibrahim B, Kalem A, Iguer-Ouada M. **Elevated non-esterified fatty acid and β -hydroxybutyrate in transition dairy cows and their association with reproductive performance and disorders: A meta-analysis.** *Theriogenology*. 2017 Apr ;93 :99–104.
238. Bicalho MLS, Lima FS, Ganda EK, Foditsch C, Meira EBS, Machado VS, et al. **Effect of trace mineral supplementation on selected minerals, energy metabolites, oxidative stress, and immune parameters and its association with uterine diseases in dairy cattle.** *Journal of Dairy Science*. 2014 Jul ;97(7) :4281–95.
239. Burke CR, Meier S, McDougall S, Compton C, Mitchell M, Roche JR. **Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture-grazed dairy cows.** *Journal of Dairy Science*. 2010 Nov ;93(11) :5363–73.
240. McArt JAA, Neves RC. **Association of transient, persistent, or delayed subclinical hypocalcemia with early lactation disease, removal, and milk yield in Holstein cows.** *Journal of Dairy Science*. 2020 Jan ;103(1) :690–701.
241. Zarrin M, De Matteis L, Vernay MCMB, Wellnitz O, Van Dorland HA, Bruckmaier RM. **Long-term elevation of β -hydroxybutyrate in dairy cows through infusion: Effects on feed intake, milk production, and metabolism.** *Journal of Dairy Science*. 2013 May ;96(5) :2960–72.
242. Zarrin M, Wellnitz O, Van Dorland HA, Bruckmaier RM. **Induced hyperketonemia affects the mammary immune response during lipopolysaccharide challenge in dairy cows.** *Journal of Dairy Science*. 2014 Jan ;97(1) :330–9.
243. Zarrin M, Wellnitz O, Van Dorland HA, Gross JJ, Bruckmaier RM. **Hyperketonemia during lipopolysaccharide-induced mastitis affects systemic and local intramammary metabolism in dairy cows.** *Journal of Dairy Science*. 2014 Jun ;97(6) :3531–41.
244. Carneiro L, Geller S, Fioramonti X, Hébert A, Repond C, Leloup C, et al. **Evidence for hypothalamic ketone body sensing: Impact on food intake and peripheral metabolic responses in mice.** *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2016 Jan ;310(2) :E103–15.

245. Carneiro L, Geller S, Hébert A, Repond C, Fioramonti X, Leloup C, et al. **Hypothalamic sensing of ketone bodies after prolonged cerebral exposure leads to metabolic control dysregulation.** *Scientific Reports*. 2016 Oct ;6(1) :34909.
246. Bertoni G, Trevisi E, Han X, Bionaz M. **Effects of Inflammatory Conditions on Liver Activity in Puerperium Period and Consequences for Performance in Dairy Cows.** *Journal of Dairy Science*. 2008 Sep ;91(9) :3300–10.
247. Humblet MF, Guyot H, Boudry B, Mbayahi F, Hanzen C, Rollin F, et al. **Relationship between haptoglobin, serum amyloid A, and clinical status in a survey of dairy herds during a 6-month period.** *Veterinary Clinical Pathology*. 2006 Jun ;35(2) :188–93.
248. Oh SK, Pavlotsky N, Tauber AI. **Specific Binding of Haptoglobin to Human Neutrophils and Its Functional Consequences.** *Journal of Leukocyte Biology*. 1990 Feb ;47(2) :142–8.
249. Raju SM, Kumar AP, Yadav AN, Rajkumar K, Mvs S, Burgula S. **Haptoglobin improves acute phase response and endotoxin tolerance in response to bacterial LPS.** *Immunology Letters*. 2019 Mar ;207 :17–27.
250. Leliefeld PHC, Wessels CM, Leenen LPH, Koenderman L, Pillay J. **The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation.** *Critical Care*. 2016 Mar ;20(1) :73.
251. Lean IJ, Bruss ML, Troutt HF, Galland JC, Farver TB, Rostami J, et al. **Bovine ketosis and somatotrophin: Risk factors for ketosis and effects of ketosis on health and production.** *Research in Veterinary Science*. 1994 Sep ;57(2) :200–9.
252. Vanholder T, Papen J, Bemers R, Vertenten G, Berge ACB. **Risk factors for subclinical and clinical ketosis and association with production parameters in dairy cows in the Netherlands.** *Journal of Dairy Science*. 2015 Feb ;98(2) :880–8.

253. Rathbun FM, Pralle RS, Bertics SJ, Armentano LE, Cho K, Do C, et al. **Relationships between body condition score change, prior mid-lactation phenotypic residual feed intake, and hyperketonemia onset in transition dairy cows.** *Journal of Dairy Science.* 2017 May ;100(5) :3685–96.
254. Emery RS, Burg N, Brown LD, Blank GN. **Detection, Occurrence, and Prophylactic Treatment of Borderline Ketosis with Propylene Glycol Feeding.** *Journal of Dairy Science.* 1964 Oct ;47(10) :1074–9.
255. Lomander H, Frössling J, Ingvarsen KL, Gustafsson H, Svensson C. **Supplemental feeding with glycerol or propylene glycol of dairy cows in early lactation—Effects on metabolic status, body condition, and milk yield.** *Journal of Dairy Science.* 2012 May ;95(5) :2397–408.
256. McArt JAA, Nydam DV, Ospina PA, Oetzel GR. **A field trial on the effect of propylene glycol on milk yield and resolution of ketosis in fresh cows diagnosed with subclinical ketosis.** *Journal of Dairy Science.* 2011 Dec ;94(12) :6011–20.
257. Borş SI, Solcan G, Vlad-Sabie A. **Effects of propylene glycol supplementation on blood indicators of hepatic function, body condition score, milk fat-protein concentration and reproductive performance of dairy cows.** *Acta Veterinaria Brno.* 2014 ;83(1) :27–32.
258. Capel MB, Bach KD, Mann S, McArt JAA. **A randomized controlled trial to evaluate propylene glycol alone or in combination with dextrose as a treatment for hyperketonemia in dairy cows.** *Journal of Dairy Science.* 2021 Feb ;104(2) :2185–94.
259. Hoedemaker M, Prange D, Zerbe H, Frank J, Daxenberger A, Meyer HHD. **Peripartur Propylene Glycol Supplementation and Metabolism, Animal Health, Fertility, and Production in Dairy Cows.** *Journal of Dairy Science.* 2004 Jul ;87(7) :2136–45.
260. Liu Q, Wang C, Yang WZ, Zhang WW, Yang XM, He DC, et al. **Effects of feeding propylene glycol on dry matter intake, lactation performance, energy balance and blood metabolites in early lactation dairy cows.** *Animal.* 2009 ;3(10) :1420–7.

261. Østergaard S, Krogh MA, Oliveira VHS, Larsen T, Otten ND. **Only few benefits from propylene glycol drench in early lactation for cows identified as physiologically imbalanced based on milk spectra analyses.** *Journal of Dairy Science.* 2020 Feb ;103(2) :1831–42.
262. Ametaj BN, Bradford BJ, Bobe G, Nafikov RA, Lu Y, Young JW, et al. **Strong relationships between mediators of the acute phase response and fatty liver in dairy cows.** *Canadian Journal of Animal Science.* 2005 Jun ;85(2) :165–75.
263. Bionaz M, Trevisi E, Calamari L, Librandi F, Ferrari A, Bertoni G. **Plasma Paraoxonase, Health, Inflammatory Conditions, and Liver Function in Transition Dairy Cows.** *Journal of Dairy Science.* 2007 Apr ;90(4) :1740–50.
264. Mullins CR, Mamedova LK, Brouk MJ, Moore CE, Green HB, Perfield KL, et al. **Effects of monensin on metabolic parameters, feeding behavior, and productivity of transition dairy cows.** *Journal of Dairy Science.* 2012 Mar ;95(3) :1323–36.
265. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. **LPS/TLR4 signal transduction pathway.** *Cytokine.* 2008 May ;42(2) :145–51.
266. Blander JM, Sander LE. **Beyond pattern recognition: Five immune checkpoints for scaling the microbial threat.** *Nature Reviews Immunology.* 2012 Mar ;12(3) :215–25.
267. Ibeagha-Awemu EM, Lee JW, Ibeagha AE, Bannerman DD, Paape MJ, Zhao X. **Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells.** *Veterinary Research.* 2008 Mar ;39(2) :11.
268. Wenz JR, Barrington GM, Garry FB, McSweeney KD, Dinsmore RP, Goodell G, et al. **Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows.** *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 2001 Oct ;219(7) :976–81.
269. Dervishi E, Ametaj BN. **Retained Placenta: A Systems Veterinary Approach.** In : Ametaj BN, editor. *Periparturient Diseases of Dairy Cows.* Cham : Springer International Publishing ; 2017. p. 121–37.

270. Vallejo-Timarán D, Reyes-Vélez J, VanLeeuwen J, Maldonado-Estrada J, Astaiza-Martínez J. **Incidence and effects of subacute ruminal acidosis and subclinical ketosis with respect to postpartum anestrus in grazing dairy cows.** *Heliyon*. 2020 Apr;6(4) :e03712.
271. Gozho GN, Plaizier JC, Krause DO, Kennedy AD, Wittenberg KM. **Subacute Ruminal Acidosis Induces Ruminal Lipopolysaccharide Endotoxin Release and Triggers an Inflammatory Response.** *Journal of Dairy Science*. 2005 Apr;88(4) :1399–403.
272. Emmanuel DGV, Madsen KL, Churchill TA, Dunn SM, Ametaj BN. **Acidosis and Lipopolysaccharide from Escherichia coli B:055 Cause Hyperpermeability of Rumen and Colon Tissues.** *Journal of Dairy Science*. 2007 Dec;90(12) :5552–7.
273. Khafipour E, Krause DO, Plaizier JC. **A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation.** *Journal of Dairy Science*. 2009 Mar;92(3) :1060–70.
274. Abuajamieh M, Kvidera SK, Fernandez MVS, Nayeri A, Upah NC, Nolan EA, et al. **Inflammatory biomarkers are associated with ketosis in periparturient Holstein cows.** *Research in Veterinary Science*. 2016 Dec;109 :81–5.
275. Dervishi E, Zhang G, Hailemariam D, Dunn SM, Ametaj BN. **Innate immunity and carbohydrate metabolism alterations precede occurrence of subclinical mastitis in transition dairy cows.** *Journal of Animal Science and Technology*. 2015 Dec;57(1) :46.
276. Dervishi E, Zhang G, Hailemariam D, Dunn SM, Ametaj BN. **Occurrence of retained placenta is preceded by an inflammatory state and alterations of energy metabolism in transition dairy cows.** *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2016 Dec;7(1) :26.
277. Dervishi E, Zhang G, Hailemariam D, Goldansaz SA, Deng Q, Dunn SM, et al. **Alterations in innate immunity reactants and carbohydrate and lipid metabolism precede occurrence of metritis in transition dairy cows.** *Research in Veterinary Science*. 2016 Feb;104 :30–9.

278. Huzzey JM, Duffield TF, LeBlanc SJ, Veira DM, Weary DM, Von Keyserlingk MAG. **Short communication: Haptoglobin as an early indicator of metritis.** *Journal of Dairy Science*. 2009 Feb;92(2) :621–5.
279. Zhang G, Hailemariam D, Dervishi E, Deng Q, Goldansaz S, Dunn S, et al. **Alterations of Innate Immunity Reactants in Transition Dairy Cows before Clinical Signs of Lameness.** *Animals*. 2015 Aug;5(3) :717–47.
280. Zhang G, Hailemariam D, Dervishi E, Goldansaz SA, Deng Q, Dunn SM, et al. **Dairy cows affected by ketosis show alterations in innate immunity and lipid and carbohydrate metabolism during the dry off period and postpartum.** *Research in Veterinary Science*. 2016 Aug;107 :246–56.
281. Csak T, Ganz M, Pespisa J, Kodys K, Dolganiuc A, Szabo G. **Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells.** *Hepatology*. 2011 Jul;54(1) :133–44.
282. Day CP, James OFW. **Steatohepatitis: A tale of two “hits”?** *Gastroenterology*. 1998 Apr;114(4) :842–5.
283. Bradford BJ, Mamedova LK, Minton JE, Drouillard JS, Johnson BJ. **Daily Injection of Tumor Necrosis Factor- α Increases Hepatic Triglycerides and Alters Transcript Abundance of Metabolic Genes in Lactating Dairy Cattle.** *The Journal of Nutrition*. 2009 Aug;139(8) :1451–6.
284. Zebeli Q, Sivaraman S, Dunn SM, Ametaj BN. **Intermittent parenteral administration of endotoxin triggers metabolic and immunological alterations typically associated with displaced abomasum and retained placenta in periparturient dairy cows.** *Journal of Dairy Science*. 2011 Oct;94(10) :4968–83.
285. Giuliadori MJ, Magnasco RP, Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido IM, Risco CA, De La Sota RL. **Metritis in dairy cows: Risk factors and reproductive performance.** *Journal of Dairy Science*. 2013 Jun;96(6) :3621–31.
286. Magata F, Sone A, Watanabe Y, Deguchi Y, Aoki T, Haneda S, et al. **Prevention of retained fetal membranes and improvement in subsequent fertility with oxytocin administration in cows with assisted calving.** *Theriogenology*. 2021 Dec;176 :200–5.

287. Asaf S, Leitner G, Furman O, Lavon Y, Kalo D, Wolfenson D, et al. **Effects of Escherichia coli- and Staphylococcus aureus-induced mastitis in lactating cows on oocyte developmental competence.** REPRODUCTION. 2014 Jan;147(1) :33–43.
288. Lavon Y, Leitner G, Moallem U, Klipper E, Voet H, Jacoby S, et al. **Immediate and carryover effects of Gram-negative and Gram-positive toxin-induced mastitis on follicular function in dairy cows.** Theriogenology. 2011 Sep;76(5) :942–53.
289. Battaglia DF, Krasa HB, Padmanabhan V, Viguié C, Karsch FJ. **Endocrine Alterations That Underlie Endotoxin-Induced Disruption of the Follicular Phase in Ewes¹.** Biology of Reproduction. 2000 Jan;62(1) :45–53.
290. Coleman ES, Elsasser TH, Kemppainen RJ, Coleman DA, Sartin JL. **Effect of Endotoxin on Pituitary Hormone Secretion in Sheep.** Neuroendocrinology. 1993;58(1) :111–22.
291. Kushibiki S, Hodate K, Shingu H, Obara Y, Touno E, Shinoda M, et al. **Metabolic and Lactational Responses during Recombinant Bovine Tumor Necrosis Factor- α Treatment in Lactating Cows.** Journal of Dairy Science. 2003 Mar;86(3) :819–27.
292. Kuhla B. **Review: Pro-inflammatory cytokines and hypothalamic inflammation: Implications for insufficient feed intake of transition dairy cows.** Animal. 2020;14 :s65–77.
293. Trevisi E, Han X, Piccioli-Cappelli F, Bertoni G. Dry matter intake reduction before calving in dairy cows : Relationship with immune system and metabolism conditions. In : 53rd meeting european association animal production, cairo, egypt, sept. 2002. p. 1–4.
294. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. :55.
295. Myers MJ, Smith ER, Turfle PG. **Biomarkers in Veterinary Medicine.** Annual Review of Animal Biosciences. 2017 Feb;5(1) :65–87.

296. Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR. Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. *Journal of Dairy Science*. 2010 Aug;93(8) :3595–601.
297. Moyes KM, Larsen T, Friggens NC, Drackley JK, Ingvarsen KL. Identification of potential markers in blood for the development of subclinical and clinical mastitis in dairy cattle at parturition and during early lactation. *Journal of Dairy Science*. 2009 Nov;92(11) :5419–28.
298. Bradford BJ, Yuan K, Farney JK, Mamedova LK, Carpenter AJ. Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. *Journal of Dairy Science*. 2015 Oct;98(10) :6631–50.
299. Duplessis M, Santschi DE, Plante S, Bergeron C, Lefebvre DM, Durocher J, et al. Milk β -hydroxybutyrate concentration measured by Fourier-transform infrared and flow-injection analyses from samples taken at different times relative to milking. *Journal of Dairy Research*. 2019 May;86(2) :208–10.
300. van der Drift SGA, Jorritsma R, Schonewille JT, Knijn HM, Stegeman JA. Routine detection of hyperketonemia in dairy cows using Fourier transform infrared spectroscopy analysis of β -hydroxybutyrate and acetone in milk in combination with test-day information. *Journal of Dairy Science*. 2012 Sep;95(9) :4886–98.
301. Gross J, Van Dorland HA, Bruckmaier RM, Schwarz FJ. Milk fatty acid profile related to energy balance in dairy cows. *Journal of Dairy Research*. 2011 Nov;78(4) :479–88.
302. Stoop WM, Bovenhuis H, Heck JML, Van Arendonk JAM. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*. 2009 Apr;92(4) :1469–78.
303. Van Knegsel ATM, Van Den Brand H, Dijkstra J, Tamminga S, Kemp B. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. *Reproduction Nutrition Development*. 2005 Nov;45(6) :665–88.

304. Nogalski Z, Wroński M, Sobczuk-Szul M, Mochol M, Pogorzelska P. **The Effect of Body Energy Reserve Mobilization on the Fatty Acid Profile of Milk in High-yielding Cows.** Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 2012 Oct;25(12) :1712–20.
305. Rukkwamsuk T, Geelen MJH, Kruip TAM, Wensing T. **Interrelation of Fatty Acid Composition in Adipose Tissue, Serum, and Liver of Dairy Cows During the Development of Fatty Liver Postpartum.** Journal of Dairy Science. 2000 Jan;83(1) :52–9.
306. Zachut M, Kra G, Portnik Y, Shapiro F, Silanikove N. **Milk glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and glucose-6-phosphate are associated with oxidative stress and serve as indicators of energy balance in dairy cows.** RSC Advances. 2016;6(70) :65412–7.
307. Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Garrison-Tikofsky L, Gonzalez RN. **Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts.** Veterinary Research. 2003 Sep;34(5) :579–96.
308. Hernández-Castellano L, Wall S, Stephan R, Corti S, Bruckmaier R. **Milk somatic cell count, lactate dehydrogenase activity, and immunoglobulin G concentration associated with mastitis caused by different pathogens: A field study.** Schweiz Arch Tierheilkd. 2017 May;159(5) :283–90.
309. Farhana A, Lappin SL. **Biochemistry, Lactate Dehydrogenase.** In : StatPearls. Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing; 2023.
310. Chagunda MGG, Friggens NC, Rasmussen MD, Larsen T. **A Model for Detection of Individual Cow Mastitis Based on an Indicator Measured in Milk.** Journal of Dairy Science. 2006 Aug;89(8) :2980–98.
311. Bogin E, Ziv G, Avidar J, Rivetz B, Gordin S, Saran A. **Distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in normal and inflamed bovine udders and milk.** Research in Veterinary Science. 1977 Mar;22(2) :198–200.
312. Kato K, Mori K, Katoh N. **Contribution of leucocytes to the origin of lactate dehydrogenase isozymes in milk of bovine mastitis.** The Japanese Journal of Veterinary Science. 1989;51(3) :530–9.

313. Kitchen BJ, Middleton G, Durward IG, Andrews RJ, Salmon MC. **Mastitis Diagnostic Tests to Estimate Mammary Gland Epithelial Cell Damage**. *Journal of Dairy Science*. 1980 Jun ;63(6) :978–83.
314. Mudaliar M, Tassi R, Thomas FC, McNeilly TN, Weidt SK, McLaughlin M, et al. **Mastitomics, the integrated omics of bovine milk in an experimental model of *Streptococcus uberis* mastitis: 2. Label-free relative quantitative proteomics**. *Molecular BioSystems*. 2016 ;12(9) :2748–61.
315. Thomas FC, Mudaliar M, Tassi R, McNeilly TN, Burchmore R, Burgess K, et al. **Mastitomics, the integrated omics of bovine milk in an experimental model of *Streptococcus uberis* mastitis: 3. Untargeted metabolomics**. *Molecular BioSystems*. 2016 ;12(9) :2762–9.
316. Thomas FC, Mullen W, Tassi R, Ramírez-Torres A, Mudaliar M, McNeilly TN, et al. **Mastitomics, the integrated omics of bovine milk in an experimental model of *Streptococcus uberis* mastitis: 1. High abundance proteins, acute phase proteins and peptidomics**. *Molecular BioSystems*. 2016 ;12(9) :2735–47.
317. Kusebauch U, Hernández-Castellano LE, Bislev SL, Moritz RL, Røntved CM, Bendixen E. **Selected reaction monitoring mass spectrometry of mastitis milk reveals pathogen-specific regulation of bovine host response proteins**. *Journal of Dairy Science*. 2018 Jul ;101(7) :6532–41.
318. Kehrlí ME, Nonnecke BJ, Roth JA. **Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period**. *American Journal of Veterinary Research*. 1989 Feb ;50(2) :215–20.
319. Vitenberga-Verza Z, Pilmane M, Šerstņova K, Melderis I, Gontar Ł, Kochański M, et al. **Identification of Inflammatory and Regulatory Cytokines IL-1 α -, IL-4-, IL-6-, IL-12-, IL-13-, IL-17A-, TNF- α -, and IFN- γ -Producing Cells in the Milk of Dairy Cows with Subclinical and Clinical Mastitis**. *Pathogens*. 2022 Mar ;11(3) :372.
320. Trevisi E, Jahan N, Bertoni G, Ferrari A, Minuti A. **Pro-Inflammatory Cytokine Profile in Dairy Cows: Consequences for New Lactation**. *Italian Journal of Animal Science*. 2015 Jan ;14(3) :3862.

321. Blagitz MG, Souza FN, Batista CF, Azevedo LFF, Benites NR, Melville PA, et al. **The neutrophil function and lymphocyte profile of milk from bovine mammary glands infected with *Streptococcus dysgalactiae***. *Journal of Dairy Research*. 2015 Nov;82(4) :460–9.
322. Sajiki Y, Konnai S, Goto S, Okagawa T, Ohira K, Shimakura H, et al. **The Suppression of Th1 Response by Inducing TGF- β 1 From Regulatory T Cells in Bovine Mycoplasmosis**. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020 Dec;7 :609443.
323. Almeida PE, Weber PSD, Burton JL, Tempelman RJ, Steibel JP, Zanella AJ. **Gene expression profiling of peripheral mononuclear cells in lame dairy cows with foot lesions**. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2007 Dec;120(3-4) :234–45.
324. Kehrli ME, Neill JD, Burvenich C, Goff JP, Lippolis JD, Reinhardt TA, et al. Energy and protein effects on the immune system. In : *Ruminant physiology : Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress*. Wageningen : Wageningen Academic Publishers; 2006. p. 455–71.
325. Sordillo LM, Mavangira V. **The nexus between nutrient metabolism, oxidative stress and inflammation in transition cows**. *Animal Production Science*. 2014;54(9) :1204.
326. Trevisi E, Zecconi A, Bertoni G, Piccinini R. **Blood and milk immune and inflammatory profiles in periparturient dairy cows showing a different liver activity index**. *Journal of Dairy Research*. 2010 Aug;77(3) :310–7.
327. Hajek F, Reus A, Gruber S, Plattner S, Kammer M, Baumgartner C, et al. **Nutzung der Haptoglobinkonzentration im Blutserum als Indikator im Tiergesundheitsmonitoring bei Milchkühen**. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G : Großtiere / Nutztiere*. 2020 Aug;48(04) :228–38.
328. Thomas FC, Waterston M, Hastie P, Parkin T, Haining H, Eckersall PD. **The major acute phase proteins of bovine milk in a commercial dairy herd**. *BMC Veterinary Research*. 2015 Dec;11(1) :207.

329. Kaya S, Merhan O, Kacar C, Colak A, Bozukluhan K. **Determination of ceruloplasmin, some other acute phase proteins, and biochemical parameters in cows with endometritis.** *Veterinary World.* 2016 Oct;9(10) :1056–62.
330. Hajimohammadi A, Nazifi S, Ansari-Lari M, Khoshmanzar MR, Bigdeli SM. **Identifying relationships among acute phase proteins (haptoglobin, serum amyloid A, fibrinogen, ceruloplasmin) and clinical findings in dairy calf diarrhea.** *Comparative Clinical Pathology.* 2013 Mar;22(2) :227–32.
331. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. **Acute phase reaction and acute phase proteins.** *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B.* 2005 Nov;6(11) :1045–56.
332. Bernabucci U, Ronchi B, Basiricò L, Pirazzi D, Rueca F, Lacetera N, et al. **Abundance of mRNA of Apolipoprotein B100, Apolipoprotein E, and Microsomal Triglyceride Transfer Protein in Liver from Periparturient Dairy Cows.** *Journal of Dairy Science.* 2004 Sep;87(9) :2881–8.
333. Trevisi E, Moscati L, Amadori M. **Disease-Predicting and Prognostic Potential of Innate Immune Responses to Noninfectious Stressors: Human and Animal Models.** In : *The Innate Immune Response to Noninfectious Stressors.* Elsevier; 2016. p. 209–35.
334. Bertoni G, Trevisi E. **Use of the Liver Activity Index and Other Metabolic Variables in the Assessment of Metabolic Health in Dairy Herds.** *Veterinary Clinics of North America : Food Animal Practice.* 2013 Jul;29(2) :413–31.
335. Bradford BJ, Swartz TH. **Review: Following the smoke signals: Inflammatory signaling in metabolic homeostasis and homeorhesis in dairy cattle.** *Animal.* 2020;14 :s144–54.
336. Stabel JR, Bannantine JP, Humphrey S. **B cell phenotypes and maturation states in cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*.** Chang YF, editor. *PLOS ONE.* 2022 Dec;17(12) :e0278313.

337. Trevisi E, Amadori M, Archetti I, Lacetera N, Bertoni G. Inflammatory response and acute phase proteins in the transition period of high-yielding dairy cows. In : Acute Phase Protein's Levels as Potential Biomarkers for Early Diagnosis of Neurodegenerative Diseases. s.l. : IntechOpen ; 2011. p. 355–80.
338. Trevisi E, Amadori M, Cogrossi S, Razzuoli E, Bertoni G. **Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows.** Research in Veterinary Science. 2012 Oct ;93(2) :695–704.
339. Heriazon A, Thompson KA, Wilkie BN, Mathes-Sears W, Quinton M, Mallard BA. **Antibody to ovalbumin and delayed-type hypersensitivity to Candida albicans and mycobacteria in lactating Holstein cows using Quil A or Freund's complete adjuvant.** Veterinary Immunology and Immunopathology. 2009 Feb ;127(3-4) :220–7.
340. Heriazon A, Yager JA, Sears W, Mallard BA. **Induction of delayed-type hypersensitivity and interferon-gamma to Candida albicans and anti-hen-egg white lysozyme antibody as phenotypic markers of enhanced bovine immune response.** Veterinary Immunology and Immunopathology. 2009 May ;129(1-2) :93–100.
341. Wagter-Lesperance L, Mallard B. Method of identifying high immune response animals. US 7,258,858 B2, 2007.
342. Hine BC, Cartwright SL, Mallard BA. **Effect of age and pregnancy status on adaptive immune responses of Canadian Holstein replacement heifers.** Journal of Dairy Science. 2011 Feb ;94(2) :981–91.
343. Hine B, Cartwright S, Mallard B. Analysis of leukocyte populations in Canadian Holsteins classified as high or low immune responders for antibody- or cell-mediated immune response. Canadian Journal of Veterinary Research. 2012 ;76 :149–56.
344. Wagter LC, Mallard BA, Wilkie BN, Leslie KE, Boettcher PJ, Dekkers JCM. **A Quantitative Approach to Classifying Holstein Cows Based on Antibody Responsiveness and Its Relationship to Peripartum Mastitis Occurrence.** Journal of Dairy Science. 2000 Mar ;83(3) :488–98.

345. Thompson-Crispi KA, Hine B, Quinton M, Miglior F, Mallard BA. **Short communication: Association of disease incidence and adaptive immune response in Holstein dairy cows.** Journal of Dairy Science. 2012 Jul ;95(7) :3888–93.
346. Thompson-Crispi KA, Miglior F, Mallard BA. **Incidence Rates of Clinical Mastitis among Canadian Holsteins Classified as High, Average, or Low Immune Responders.** Clinical and Vaccine Immunology. 2013 Jan ;20(1) :106–12.
347. Wagter LC, Mallard BA, Wilkie BN, Leslie KE, Boettcher PJ, Dekkers JCM. **The Relationship Between Milk Production and Antibody Response to Ovalbumin During the Peripartum Period.** Journal of Dairy Science. 2003 Jan ;86(1) :169–73.
348. Duffy D, Rouilly V, Libri V, Hasan M, Beitz B, David M, et al. **Functional Analysis via Standardized Whole-Blood Stimulation Systems Defines the Boundaries of a Healthy Immune Response to Complex Stimuli.** Immunity. 2014 Mar ;40(3) :436–50.
349. Ingvarstsen KL, Moyes K. **Nutrition, immune function and health of dairy cattle.** Animal. 2013 ;7 :112–22.
350. Käppeli N, Morach M, Zurfluh K, Corti S, Nüesch-Inderbinnen M, Stephan R. **Sequence Types and Antimicrobial Resistance Profiles of Streptococcus uberis Isolated From Bovine Mastitis.** Frontiers in Veterinary Science. 2019 Jul ;6 :234.
351. Dembic Z. **Immune system protects integrity of tissues.** Molecular Immunology. 2000 Aug ;37(10) :563–9.
352. Breen EJ, Tan W, Khan A. **The Statistical Value of Raw Fluorescence Signal in Luminex xMAP Based Multiplex Immunoassays.** Scientific Reports. 2016 Jul ;6(1) :26996.
353. Findlay JWA, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, Desilva BS, et al. **Validation of immunoassays for bioanalysis: A pharmaceutical industry perspective.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2000 ;21(6) :1249–73.

354. Cohen L, Fiore-Gartland A, Randolph AG, Panoskaltsis-Mortari A, Wong SS, Ralston J, et al. **A Modular Cytokine Analysis Method Reveals Novel Associations With Clinical Phenotypes and Identifies Sets of Co-signaling Cytokines Across Influenza Natural Infection Cohorts and Healthy Controls.** *Frontiers in Immunology.* 2019 Jun;10 :1338.
355. O'Brien MB, McLoughlin RM, Meade KG. **Application of the TruCulture® whole blood stimulation system for immune response profiling in cattle.** *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2020 Mar;221 :110025.
356. Buggiotti L, Cheng Z, Salavati M, Wathes CD, the Genotype plus Environment Consortium, Fahey A, et al. **Comparison of the transcriptome in circulating leukocytes in early lactation between primiparous and multiparous cows provides evidence for age-related changes.** *BMC Genomics.* 2021 Dec;22(1) :693.
357. Cheng Z, Ferris C, Crowe MA, Ingvarsten KL, Grelet C, Vanlierde A, et al. **Hepatic Global Transcriptomic Profiles of Holstein Cows According to Parity Reveal Age-Related Changes in Early Lactation.** *International Journal of Molecular Sciences.* 2023 Jun;24(12) :9906.
358. Alberti S, Cevenini E, Ostan R, Capri M, Salvioli S, Bucci L, et al. **Age-dependent modifications of Type 1 and Type 2 cytokines within virgin and memory CD4+ T cells in humans.** *Mechanisms of Ageing and Development.* 2006 Jun;127(6) :560–6.
359. Shearer GM. **Th1/Th2 changes in aging.** *Mechanisms of Ageing and Development.* 1997 Mar;94(1-3) :1–5.
360. Albright JW, Zúñiga-Pflücker JC, Albright JF. **Transcriptional Control of IL-2 and IL-4 in T Cells of Young and Old Mice.** *Cellular Immunology.* 1995 Sep;164(2) :170–5.
361. Hobbs MV, Weigle WO, Noonan DJ, Torbett BE, McEvilly RJ, Koch RJ, et al. **Patterns of cytokine gene expression by CD4+ T cells from young and old mice.** *The Journal of Immunology.* 1993 Apr;150(8) :3602–14.

362. Madduru D, Dirsipam K, Goli M, Ramana Devi V, Jahan P. **Association of reduced maternal sHLA-G5 isoform levels and elevated TNF- α /IL-4 cytokine ratio with Recurrent Pregnancy Loss: A study on South Indian women.** *Scandinavian Journal of Immunology*. 2021 Oct ;94(4).
363. Chatterjee P, Chiasson VL, Bounds KR, Mitchell BM. **Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy.** *Frontiers in Immunology*. 2014 May ;5.
364. Yang L, Wang Y, Li S, Zhu M, He K, Yao X, et al. **Differential expression of interferon-gamma, IL-4 and IL-10 in peripheral blood mononuclear cells during early pregnancy of the bovine.** *Reproductive Biology*. 2018 Sep ;18(3) :312–5.
365. Germon P, Barbey S, Lefebvre R, Boichard D, Foucras G, Rainard P. Cows selected for resistance to mastitis show contrasted immune responses compared to mastitis susceptible cows. Seattle, USA ; 2019.
366. Pyrrillou K, Burzynski LC, Clarke MCH. **Alternative Pathways of IL-1 Activation, and Its Role in Health and Disease.** *Frontiers in Immunology*. 2020 Dec ;11 :613170.
367. Rainard P, Cunha P, Martins RP, Gilbert FB, Germon P, Foucras G. **Type 3 immunity: A perspective for the defense of the mammary gland against infections.** *Veterinary Research*. 2020 Dec ;51(1) :129.
368. Woytschak J, Keller N, Krieg C, Impellizzieri D, Thompson RW, Wynn TA, et al. **Type 2 Interleukin-4 Receptor Signaling in Neutrophils Antagonizes Their Expansion and Migration during Infection and Inflammation.** *Immunity*. 2016 Jul ;45(1) :172–84.
369. Bougarn S, Cunha P, Gilbert FB, Harmache A, Foucras G, Rainard P. **Staphylococcal-associated molecular patterns enhance expression of immune defense genes induced by IL-17 in mammary epithelial cells.** *Cytokine*. 2011 Dec ;56(3) :749–59.

370. Shahrara S, Pickens SR, Mandelin AM, Karpus WJ, Huang Q, Kolls JK, et al. **IL-17-Mediated Monocyte Migration Occurs Partially through CC Chemokine Ligand 2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Induction.** *The Journal of Immunology.* 2010 Apr;184(8) :4479–87.
371. Benedet A, Costa A, De Marchi M, Penasa M. **Heritability estimates of predicted blood β -hydroxybutyrate and nonesterified fatty acids and relationships with milk traits in early-lactation Holstein cows.** *Journal of Dairy Science.* 2020 Jul;103(7) :6354–63.
372. Zhang Y, Li X, Zhang H, Zhao Z, Peng Z, Wang Z, et al. **Non-Esterified Fatty Acids Over-Activate the TLR2/4-NF- κ B Signaling Pathway to Increase Inflammatory Cytokine Synthesis in Neutrophils from Ketotic Cows.** *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2018;48(2) :827–37.
373. Entrican G. **Immune Regulation during Pregnancy and Host–Pathogen Interactions in Infectious Abortion.** *Journal of Comparative Pathology.* 2002 Feb;126(2-3) :79–94.
374. Raghupathy R. **Th 1-type immunity is incompatible with successful pregnancy.** *Immunology Today.* 1997 Oct;18(10) :478–82.
375. Brink AA, Weber WJ, Lippolis JD, Cole JB, Rendahl AK, Caixeta L, et al. **Effect of Holstein genotype on ex-vivo interleukin-1 β response to lipopolysaccharide (LPS), lipoteichoic acid (LTA) and heat-killed Gram-negative and Gram-positive bacteria.** *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2023 Apr;258 :110573.
376. Faaz R, Abdullah F. **Expressions of IL4, IL10, and IFN γ cytokines genes during bacterial mastitis.** *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research.* 2022;9(1) :42.
377. Sun X, Glynn DJ, Hodson LJ, Huo C, Britt K, Thompson EW, et al. **CCL2-driven inflammation increases mammary gland stromal density and cancer susceptibility in a transgenic mouse model.** *Breast Cancer Research.* 2017 Dec;19(1) :4.

378. Kluciński W, Degórski A, Miernik-Degórska E, Targowski S, Winnicka A. **Effect of ketone bodies on the phagocytic activity of bovine milk macrophages and polymorphonuclear leukocytes.** Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe A. 1988 Sep;35(8) :632–9.
379. Goulart DB, Mellata M. **Escherichia coli Mastitis in Dairy Cattle: Etiology, Diagnosis, and Treatment Challenges.** Frontiers in Microbiology. 2022 Jul;13 :928346.
380. Pidwill GR, Gibson JF, Cole J, Renshaw SA, Foster SJ. **The Role of Macrophages in Staphylococcus aureus Infection.** Frontiers in Immunology. 2021 Jan;11 :620339.
381. Papinchak L, Paudyal S, Pineiro J. **Effects of prolonged lock-up time on milk production and health of dairy cattle.** Veterinary Quarterly. 2022 Dec;42(1) :175–82.
382. Niu X, Ding Y, Chen S, Gooneratne R, Ju X. **Effect of Immune Stress on Growth Performance and Immune Functions of Livestock: Mechanisms and Prevention.** Animals. 2022 Apr;12(7) :909.
383. Rainard P, Foucras G, Fitzgerald JR, Watts JL, Koop G, Middleton JR. **Knowledge gaps and research priorities in Staphylococcus Aureus mastitis control.** Transboundary and Emerging Diseases. 2018 May;65 :149–65.
384. Dobrakowski M, Boroń M, Czuba ZP, Kasperczyk A, Machoń-Grecka A, Kasperczyk S. **Cytokines related to three major types of cell-mediated immunity in short- and long-term exposures to lead compounds.** Journal of Immunotoxicology. 2016 Nov;13(6) :770–4.
385. Chiswick EL, Duffy E, Japp B, Remick D. **Detection and Quantification of Cytokines and Other Biomarkers.** In : Ashman RB, editor. Leucocytes. Totowa, NJ : Humana Press ; 2012. p. 15–30.
386. Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K. **Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of Escherichia coli.** Bacteriological Reviews. 1977 Sep;41(3) :667–710.

387. Josephson KL, Gerba CP, Pepper IL. **Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens**. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993 Oct;59(10) :3513–5.
388. Praud A, Boschirola ML, Meyer L, Garin-Bastuji B, Dufour B. **Assessment of the sensitivity of the gamma-interferon test and the single intradermal comparative cervical test for the diagnosis of bovine tuberculosis under field conditions**. *Epidemiology and Infection*. 2015 Jan ;143(1) :157–66.
389. Smith K, Kleynhans L, Warren RM, Goosen WJ, Miller MA. **Cell-Mediated Immunological Biomarkers and Their Diagnostic Application in Livestock and Wildlife Infected With Mycobacterium bovis**. *Frontiers in Immunology*. 2021 Mar;12 :639605.
390. Westerhuis JA, van Velzen EJJ, Hoefsloot HCJ, Smilde AK. **Multivariate paired data analysis: Multilevel PLSDA versus OPLSDA**. *Metabolomics*. 2010;6(1) :119–28.
391. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. **An introduction to immunology and immunopathology**. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2018 Sep;14(S2) :49.
392. Engler C, Renna MS, Beccaria C, Silvestrini P, Pirola SI, Pereyra EAL, et al. **Differential immune response to two Staphylococcus aureus strains with distinct adaptation genotypes after experimental intramammary infection of dairy cows**. *Microbial Pathogenesis*. 2022 Nov;172 :105789.
393. Iwasaki A, Medzhitov R. **Control of adaptive immunity by the innate immune system**. *Nature Immunology*. 2015 Apr;16(4) :343–53.
394. Montazersaheb S, Hosseiniyan Khatibi SM, Hejazi MS, Tarhriz V, Farjami A, Ghasemian Sorbeni F, et al. **COVID-19 infection: An overview on cytokine storm and related interventions**. *Virology Journal*. 2022 May;19(1) :92.
395. De Vries A, Marcondes MI. **Review: Overview of factors affecting productive lifespan of dairy cows**. *Animal*. 2020;14 :s155–64.

396. Palacios-Pedrero MÁ, Jansen JM, Blume C, Stanislawski N, Jonczyk R, Molle A, et al. **Signs of immunosenescence correlate with poor outcome of mRNA COVID-19 vaccination in older adults.** *Nature Aging.* 2022 Oct;2(10) :896–905.
397. Eurostat. Life expectancy by age and sex. 2023.
398. Lu X, Jiang H, Arbab AAI, Wang B, Liu D, Abdalla IM, et al. **Investigating Genetic Characteristics of Chinese Holstein Cow's Milk Somatic Cell Score by Genetic Parameter Estimation and Genome-Wide Association.** *Agriculture.* 2023 Jan ;13(2) :267.
399. Gonen E, Nedvetzki S, Naor D, Shpigel NY. **CD44 is highly expressed on milk neutrophils in bovine mastitis and plays a role in their adhesion to matrix and mammary epithelium.** *Veterinary Research.* 2008 May ;39(3) :29.
400. FAO. Greenhouse Gas Emissions from the Dairy Sector : A Life Cycle Assessment. Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations ; 2010.
401. Ishikawa H, Shirahata T, Hasegawa K. **Interferon- γ . Production of Mitogen Stimulated Peripheral Lymphocytes in Perinatal Cows.** *Journal of Veterinary Medical Science.* 1994 ;56(4) :735–8.
402. Kimura K, Goff JP, Kehrl ME, Harp JA. **Phenotype Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Periparturient Dairy Cows.** *Journal of Dairy Science.* 1999 Feb ;82(2) :315–9.
403. Chard T. An introduction to radioimmunoassay and related techniques. 5th rev. ed. Amsterdam : Elsevier ; 1995. (Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology).
404. Braggio S, Barnaby RJ, Grossi P, Cugola M. **A strategy for validation of bioanalytical methods.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 1996 Feb ;14(4) :375–88.

405. Litov L, Petkov P, Rangelov M, Ilieva N, Lilkova E, Todorova N, et al. **Molecular Mechanism of the Anti-Inflammatory Action of Heparin**. International Journal of Molecular Sciences. 2021 Oct ;22(19) :10730.
406. Brøndum L, Sørensen BS, Eriksen JG, Mortensen LS, Lønbro S, Overgaard J, et al. **An evaluation of multiplex bead-based analysis of cytokines and soluble proteins in archived lithium heparin plasma, EDTA plasma and serum samples**. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. 2016 Nov ;76(8) :601–11.
407. Rainard P. **Consequences of Interference of Milk with Chemoattractants for Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Quantifications**. Clinical and Vaccine Immunology. 2010 May ;17(5) :848–52.
408. Cebron N, Maman S, Walachowski S, Gausserès B, Cunha P, Rainard P, et al. **Th17-related mammary immunity, but not a high systemic Th1 immune response is associated with protection against E. Coli mastitis**. NPJ vaccines. 2020 Nov ;5(1) :108.
409. Multiplexage. Larousse. 2022.

Annexes

A Contexte économique et social

TABLEAU 1. : Évolution des performances économiques des exploitations bovines laitières en Europe de 2008 à 2019 (FADN)

Année	2008	2009	2010	2011	2012
Nombre de fermes	750719	688650	632757	628090	601155
Part de la production laitière (%)	0,8926	0,8926	0,9063	0,9104	0,8979
Surface fourragère (ha)	25,57	26,69	29,87	30,46	30,72
Nombre de vaches laitières (UGB)	26,41	28,5	30,96	31,54	32,32
Main d'oeuvre (UTA)	1,937	1,882	1,864	1,863	1,82
Part du travail familial (%)	0,8408	0,8383	0,8234	0,8215	0,8182
Lait produit par hectare de surface fourragère (t/ha)	7,202	7,84	7,642	8,026	7,943
Production laitière (kg/vache)	6486	6556	6757	6908	6840
Production laitière totale (t)	171,3	186,9	209,2	217,9	221,1
Prix du lait (€/t)	332,2	273,6	315,3	350,4	338,8
Nourriture produite sur place	31,08	27	27,7	30,64	32,91
Nourriture achetée	69,44	60,37	64,18	76,77	83,71
Marge nette	32,89	-0,1514	27,06	41,45	16,78
Marge nette avec les aides couplées	34,74	1,712	30,07	44,46	19,84
Revenu net de la ferme	11522	8327	14571	16327	13647

2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
582408	542584	528637	482108	458105	455581	446797
0,9161	0,9143	0,913	0,9136	0,9338	0,9342	0,93
32,19	34,04	33,49	36,21	39,35	39,76	40,66
34,19	36,68	37,8	41,07	44,72	44,59	45,47
1,85	1,897	1,824	1,856	1,971	1,954	1,98

2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
0,804	0,8081	0,8086	0,8056	0,7858	0,7804	0,7702
7,673	7,886	8,507	8,404	8,587	8,498	8,586
6875	6965	7134	7129	7299	7390	7508
235	255,4	269,6	292,8	326,4	329,5	341,3
375,9	383,2	320,4	302,6	363,3	355,6	356,92
34,21	40,05	38,29	36	34,91	36,96	37,75
90,85	86,96	81,41	79,85	81,19	88,95	88,76
33,82	37,55	4,191	-7,967	44,72	19,63	22,86
36,28	40,61	10,55	-1,376	51,51	26,38	29,47
16561	17032	13410	14162	23506	18686	19370

B Index génétiques

TABLEAU 2. : *Index génétiques fonctionnels.*

Sigle	Nom complet	Description
Santé mammaire		
INCELL	comptages cellulaires	qualité du lait et résistance aux mammites
INMACL	mammites cliniques	résistance aux mammites
INSAMA	santé mammaire	synthèse des index liés à la santé mammaire
Fertilité		
INFERT	fertilité des vaches	fertilité post-partum de la descendance femelle
INFERG	fertilité des génisses	fertilité post-partum des génisses
INVIA1	IVIA1	aptitude au retour en cyclicité post-partum
INFERS	fertilité	synthèse des index liés à la fertilité
Conditions de vêlage		
INFNAI	facilité de naissance	conditions de vêlage liées aux veaux
INFVEL	facilité de vêlage	conditions de vêlage liées à la descendance femelle
Vitalité des veaux		
INVITN	vitalité naissance	mortalité de la descendance dans les 48h suivant le vêlage
INVITV	vitalité vêlage	mortalité des veaux issus de la descendance femelle dans les 48h suivant le vêlage
Longévité		
INLGFO	longévité fonctionnelle	aptitude de la descendance femelle à ne pas subir une réforme involontaire

TABLEAU 3. : *Index génétiques de production.*

Sigle	Nom complet	Description
INLAIT	lait	quantité de lait (kg)
INDEMP	matière protéique	quantité de matière protéique (kg)

Sigle	Nom complet	Description
INDEMG	matière grasse	quantité de matière grasse (kg)
INDETP	taux protéique	taux protéique vrai (g/kg)
INDETB	taux butyreux	taux butyreux ou taux de matière grasse (g/kg)
INEL	économique laitier	reflet de la marge nette hors travail
ISU	index de synthèse unique	synthèse de l'ensemble des caractères (laitiers, fonctionnels et morphologiques)

TABLEAU 4. : *Index génétiques morphologiques.*

Sigle	Nom complet	Description
INTR	vitesse de traite	
INPS	profondeur du sillon de la mamelle	
INPJ	distance plancher-jarret	
INEQ	équilibre avant-arrière de la mamelle	
INEA	écart avant des trayons	
INIA	implantation arrière des trayons	
INLT	longueur des trayons	
INHS	hauteur au sacrum	
INTE	tempérament	
INAA	attache avant mamelle	
INIB	inclinaison du bassin	
INAJ	angle du jarret	
INAH	hauteur attache mamelle	
INLP	largeur poitrine	
INPC	profondeur du corps	
INAS	aspect	
INLI	largeur ischions	
INLO	locomotion	
INMR	membre vue arrière	
INPI	angle du pied	
INEC	état corporel	
INMA	mamelle	synthèse de la conformation de la mamelle
INCC	capacité corporelle	synthèse de la conformation corporelle
INME	membres	synthèse de la conformation des membres
INMO	morphologie	synthèse morphologique globale

C Multiplexage : technologie Luminex® xMAP®

Le multiplexage se définit comme une « combinaison de signaux indépendants en un seul signal composite destiné à être transmis sur une voie commune » (409). Notion faisant son apparition dans le domaine des télécommunications, en biologie, le multiplexage désigne des méthodes permettant de doser simultanément de multiples molécules dans un échantillon.

C.1 Technologie xMAP®

xMAP® est un acronyme signifiant *unknown Multi Analyte Profiling*. Cette technologie reprend les principes de l'ELISA et d'hybridation des acides nucléiques à des fins de multiplexage. Elle repose sur l'usage de microbilles de polystyrène classiques (MicroPlex®) ou aimantées (MagPlex®) mesurant respectivement 5,6 μm et 6,5 μm de diamètre. Leur surface est recouverte de groupes carboxyles. Ces derniers sont capables de réagir avec des groupes amines pour former une liaison covalente de type amide (Figure 1). Ils peuvent donc se lier directement à une protéine ou indirectement à un acide nucléique par le biais d'une amine intermédiaire. Celle-ci présente l'avantage d'éloigner les acides nucléiques de la microbille et de diminuer l'encombrement stérique. Ainsi, l'hybridation entre l'acide nucléique de « capture » et l'acide nucléique « cible » est facilitée. Les protéines de « capture » peuvent avoir des fonctions diverses : anticorps, antigène, récepteur, ligand ou encore enzyme. Leur point commun est leur capacité à se lier spécifiquement à une molécule cible, ou analyte. Les billes classiques et aimantées possèdent respectivement 100 et 500 sites de fixation. Les secondes offrent plus de sites de fixation du fait d'une surface plus grande. Chaque bille est teintée avec deux colorants fluorescents : l'un répondant aux rayonnements rouges et l'autre aux rayonnements du proche infrarouge. À cette fin, les billes sont plongées dans une solution organique contenant les colorants à des concentrations précises. Une fois les colorants absorbés, les billes sont retirées de la solution organique et placées dans une solution aqueuse. En raison de leur caractère hydrophobe, les colorants restent à l'intérieur des billes. La combinaison

des intensités de fluorescence émises par chacun des colorants permet d'identifier les billes et, indirectement, leur analyte cible (Figure 2).

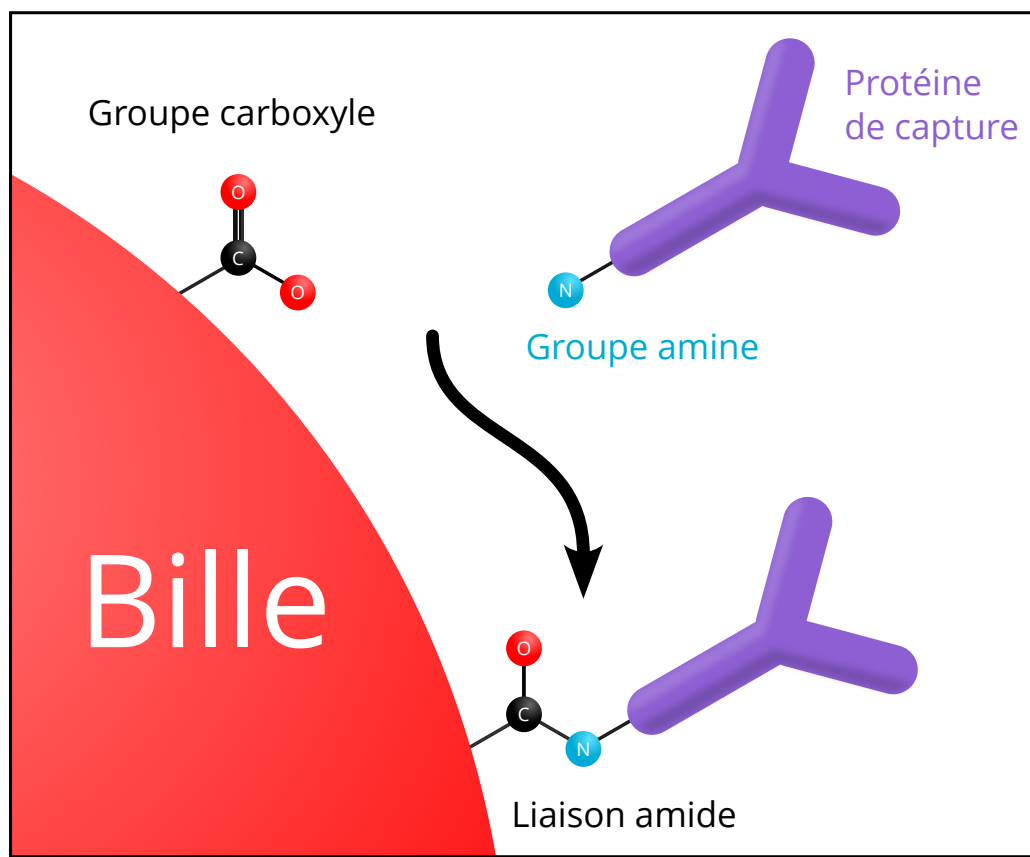


FIGURE 1. : Formation de la liaison amide entre les groupes carboxyles des microbilles et les fonctions amines des protéines de capture.

La quantification des analytes requiert une étape de marquage. Celle-ci diffère selon la nature de l'analyte. En effet, les protéines peuvent être marquées directement ou indirectement au moyen d'une autre protéine portant le marqueur fluorescent (Figure 2). Contrairement aux protéines de capture, les protéines de marquage sont peu spécifiques et doivent être capables de se lier à l'ensemble des analytes ciblés par les billes.

Ainsi, l'utilisation de la technologie xMAP[®] pour doser des biomarqueurs offre de nombreux avantages :

- simultanéité des dosages,
- utilisation d'un volume réduit d'échantillons,
- gain de temps et réduction des coûts,
- existence de nombreux kits commerciaux prêts à l'emploi,

- possibilité de créer des kits personnalisés,
- réduction du nombre de manipulations par les opérateurs,
- gain de reproductibilité.

C.2 Instruments de mesure

La lecture des microbilles nécessite des instruments de mesure particuliers. Il en existe deux types : les cytomètres de flux (LUMINEX[®] 100/200, FLEXMAP 3D[®] et xMAP INTELLIFLEX[®]) et les systèmes d'imagerie par fluorescence (MAGPIX[®]). Le MAGPIX[®] étant l'instrument utilisé pour réaliser les dosages dans le cadre de l'étude, seuls ses principes de fonctionnement seront présentés. Il s'agit d'un système d'imagerie par fluorescence. Il est composé d'un module de mise en circulation des fluides et d'un module optique. Ce dernier est composé d'une chambre de lecture, d'un aimant, de diodes électroluminescentes (DEL) rouges (630 nm) et vertes (515-521 nm), et d'un capteur photographique CCD (Figure 2). Le module de mise en circulation des fluides assure l'acheminement des échantillons jusqu'à la chambre de lecture du module optique. Une fois l'échantillon en place, l'aimant s'approche de la chambre de lecture pour agencer les billes en une seule couche. Ensuite, les DEL rouges s'activent pour illuminer les billes. Le capteur CCD prend deux photographies pour chacune des fluorescences émises par les colorants, séparées au préalable par un filtre. Ensuite, les DEL vertes éclairent la chambre de lecture pour obtenir les fluorescences du marqueur et le capteur CCD prend une dernière photo. Pour finir, la chambre est vidée et rincée pour laisser la place à un nouvel échantillon. Les étapes précédentes sont illustrées dans la (Figure 2). Les photographies sont analysées pour extraire les intensités de fluorescence des colorants et du marqueur. Ces intensités sont mesurées à l'échelle de la bille. Pour chaque échantillon et chaque analyte, les intensités de fluorescence des marqueurs sont agrégées en une MFI. Cette dernière permet d'estimer indirectement la concentration de l'analyte au moyen d'une courbe dose-réponse. Le système MAGPIX[®] est compatible avec les plaques de 96 puits à fond conique, plat ou rond. Il peut doser jusqu'à 50 analytes par échantillon et réaliser 4 800 points de mesure en moins d'une heure. Sa sensibilité est telle qu'il

peut doser des protéines à des concentrations de l'ordre du picogramme par millilitre et des acides nucléiques avoisinant les dix millions de copies par millilitre. Du fait de son mode de fonctionnement, il est compatible uniquement avec les microbilles aimantées (MagPlex[®]).

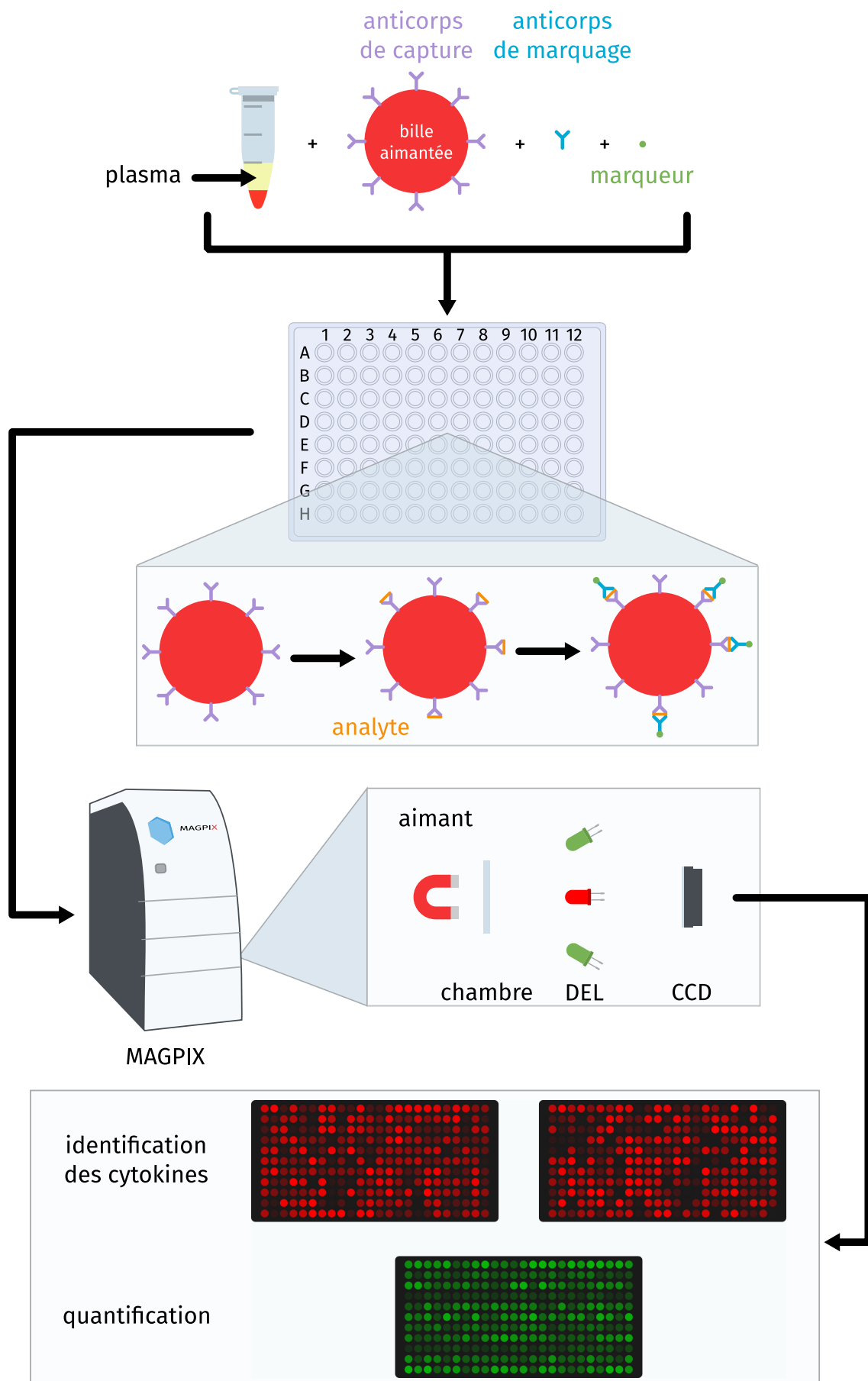


FIGURE 2. : Principes de fonctionnement de la technologie xMAP[®] et du MAGPIX[®].

D Synthèse des résultats des régressions linéaires

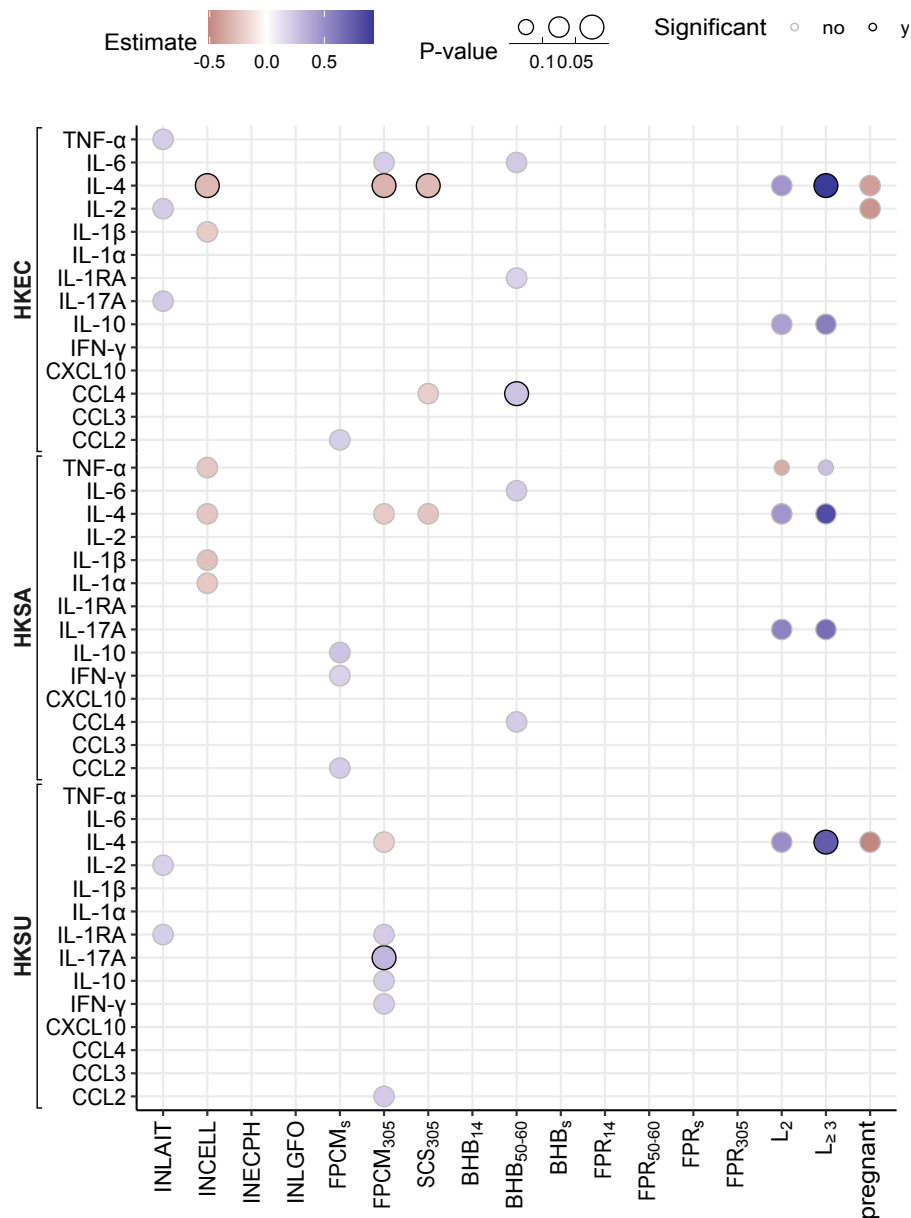


FIGURE 3. : Résultats des régressions linéaires après sélection de variables avec un algorithme pas-à-pas ascendant utilisant comme critère le rapport de vraisemblance. Les abscisses et les ordonnées représentent les variables indépendantes et les cytokines dosées après stimulation avec les bactéries (HKEC, HKSA et HKSU), respectivement. La taille et la couleur d'un point correspondent à la p-valeur et au coefficient d'une variable indépendante donnée, respectivement. Les variables ayant un effet significatif sont entourées en noir.

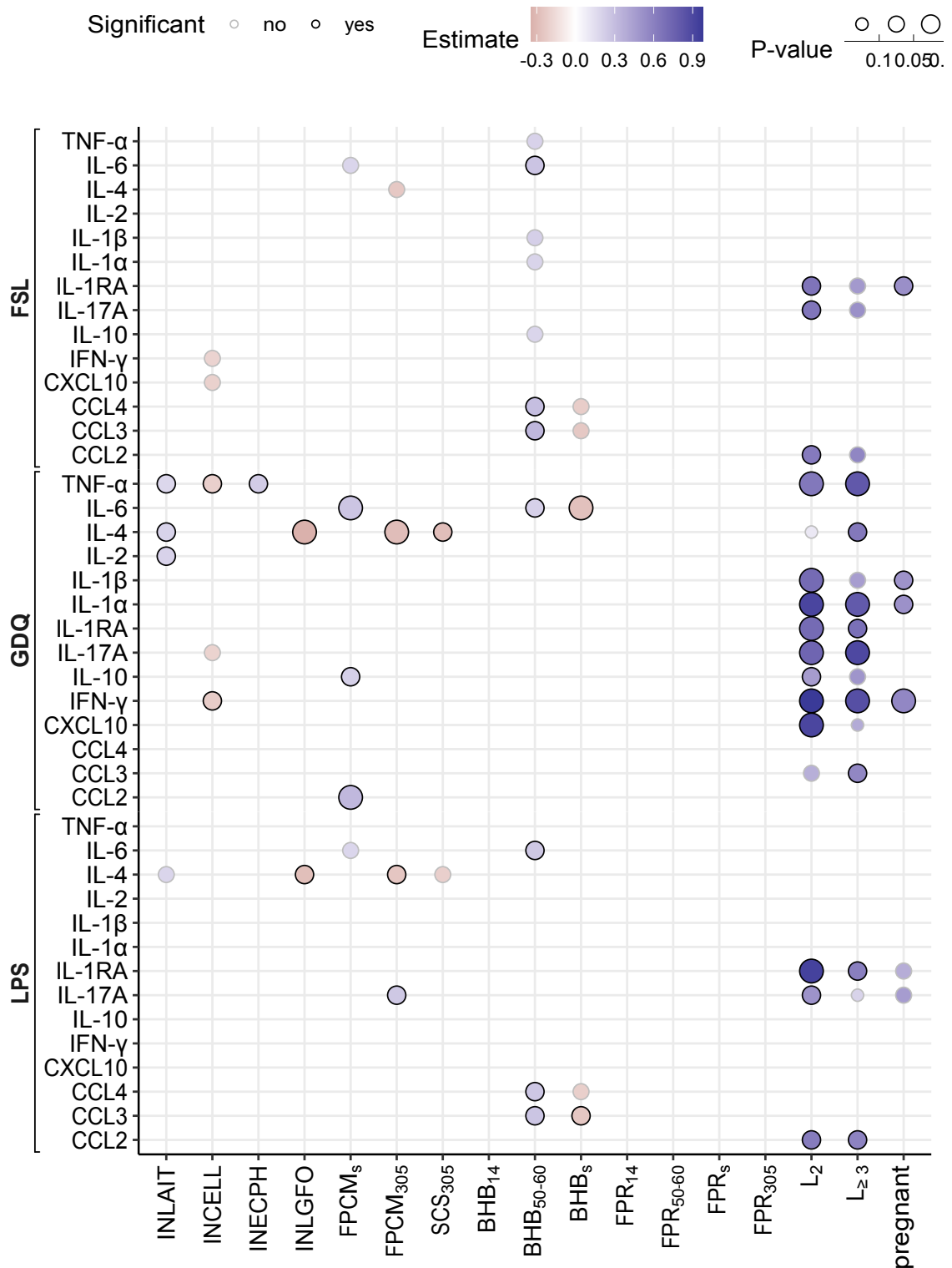


FIGURE 4. : Résultats des régressions linéaires après sélection de variables avec un algorithme pas-à-pas ascendant utilisant comme critère le rapport de vraisemblance. Les abscisses et les ordonnées représentent les variables indépendantes et les cytokines dosées après stimulation avec les ligands TLR (LPS, FSL-1 et GDQ), respectivement. La taille et la couleur d'un point correspondent à la p-valeur et au coefficient d'une variable indépendante donnée, respectivement. Les variables ayant un effet significatif sont entourées en noir.

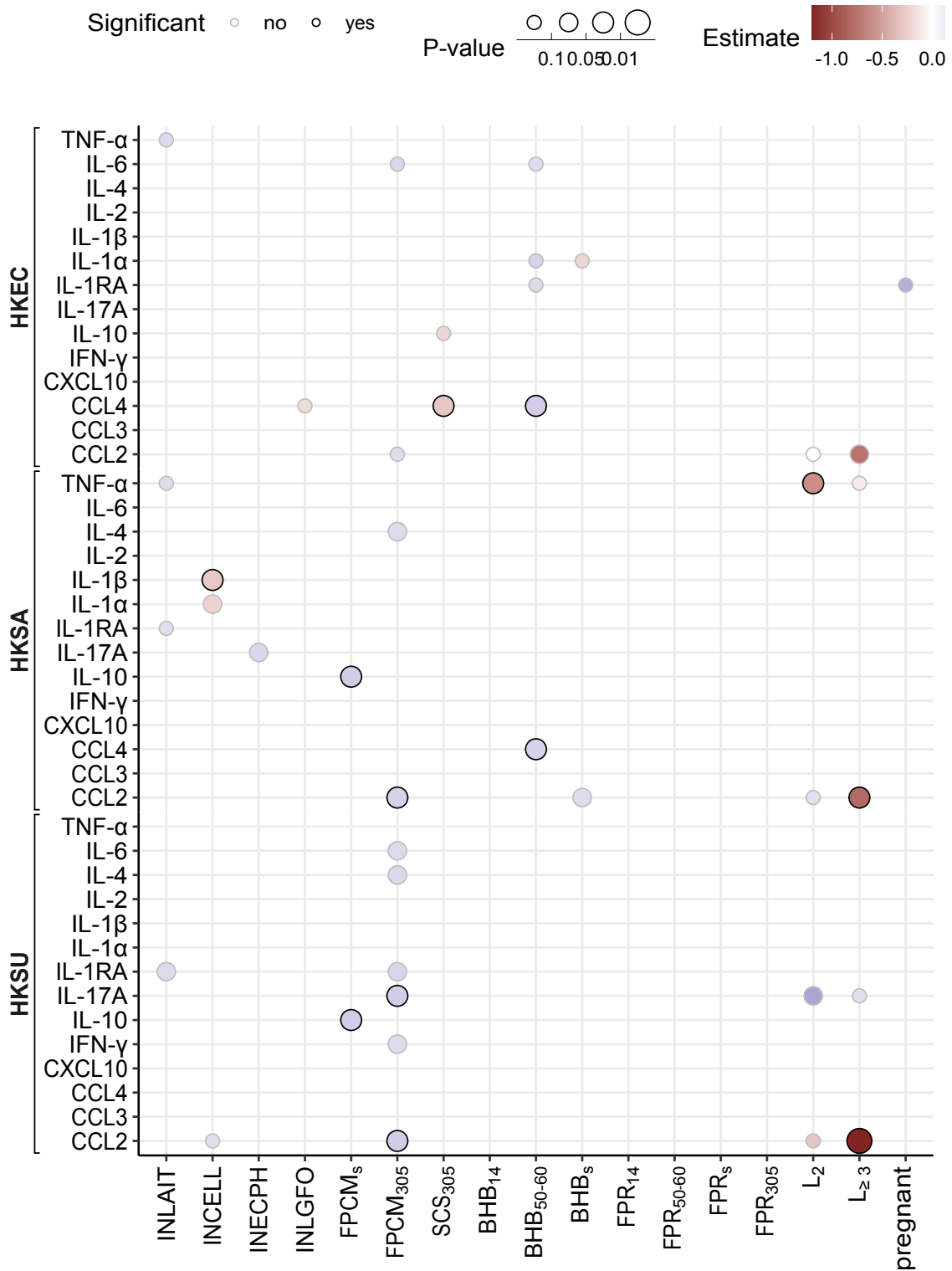


FIGURE 5. : Résultats des régressions linéaires après sélection de variables avec un algorithme pas-à-pas ascendant utilisant comme critère le rapport de vraisemblance. Les abscisses et les ordonnées représentent les variables indépendantes et les valeurs delta obtenus après stimulation avec les bactéries (HKEC, HKSA et HKSU), respectivement. La taille et la couleur d'un point correspondent à la p-valeur et au coefficient d'une variable indépendante donnée, respectivement. Les variables ayant un effet significatif sont entourées en noir.

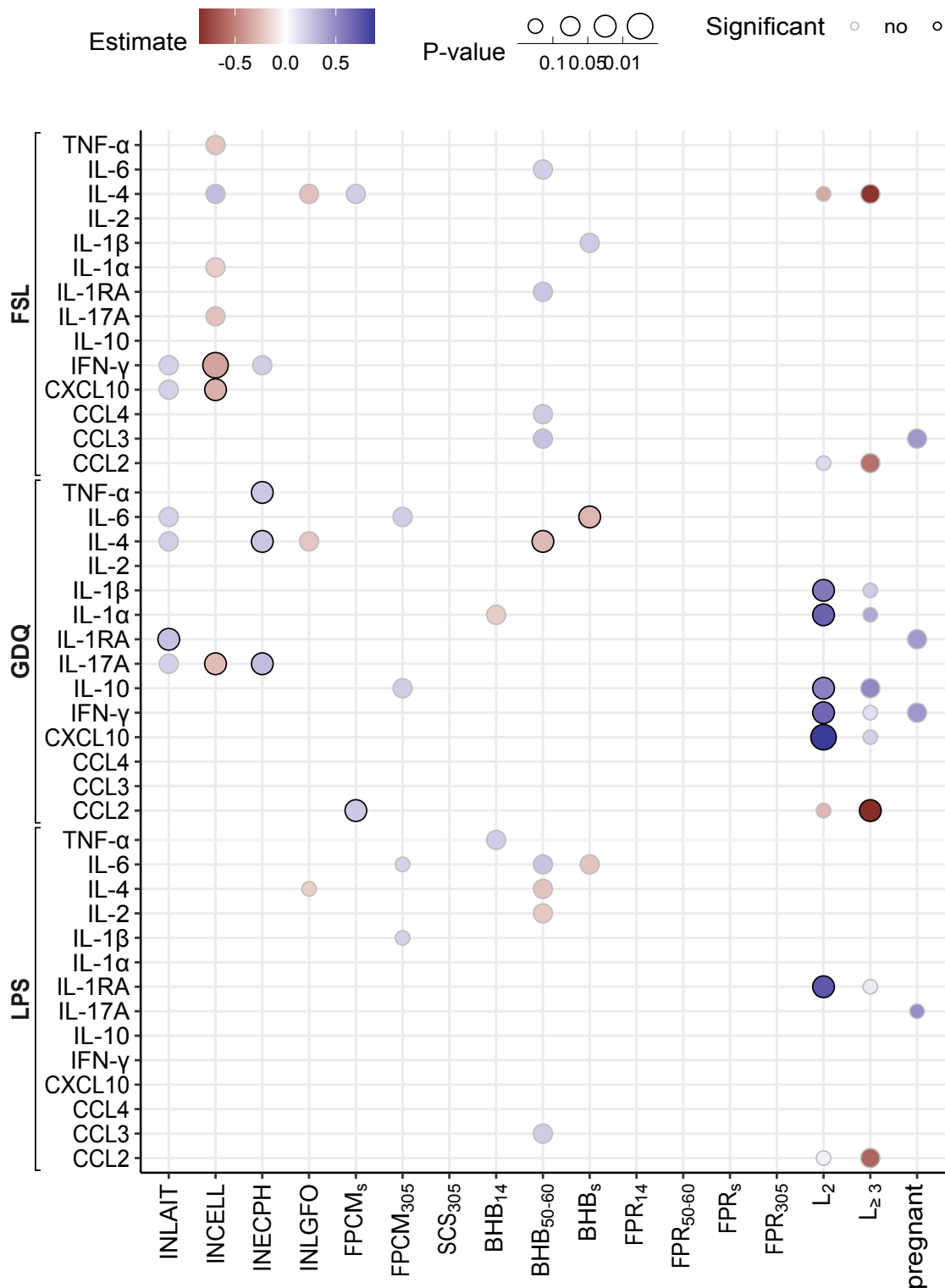


FIGURE 6. : Résultats des régressions linéaires après sélection de variables avec un algorithme pas-à-pas ascendant utilisant comme critère le rapport de vraisemblance. Les abscisses et les ordonnées représentent les variables indépendantes et les valeurs delta obtenus après stimulation avec les ligands TLR (LPS, FSL-1 et GDQ), respectivement. La taille et la couleur d'un point correspondent à la p-valeur et au coefficient d'une variable indépendante donnée, respectivement. Les variables ayant un effet significatif sont entourées en noir.

E Cercles des corrélations

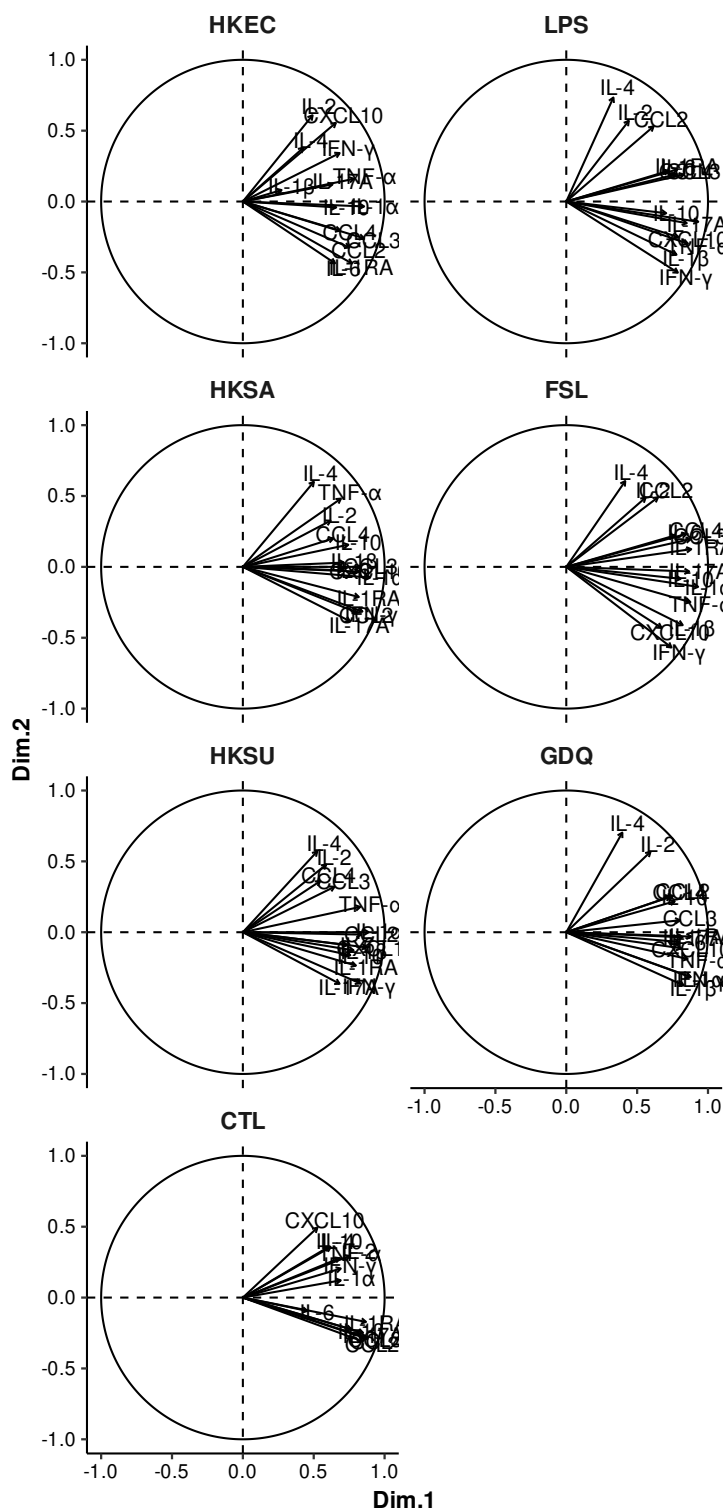


FIGURE 7. : Cercles des corrélations relatifs aux ACP conduites sur les concentrations absolues des cytokines.

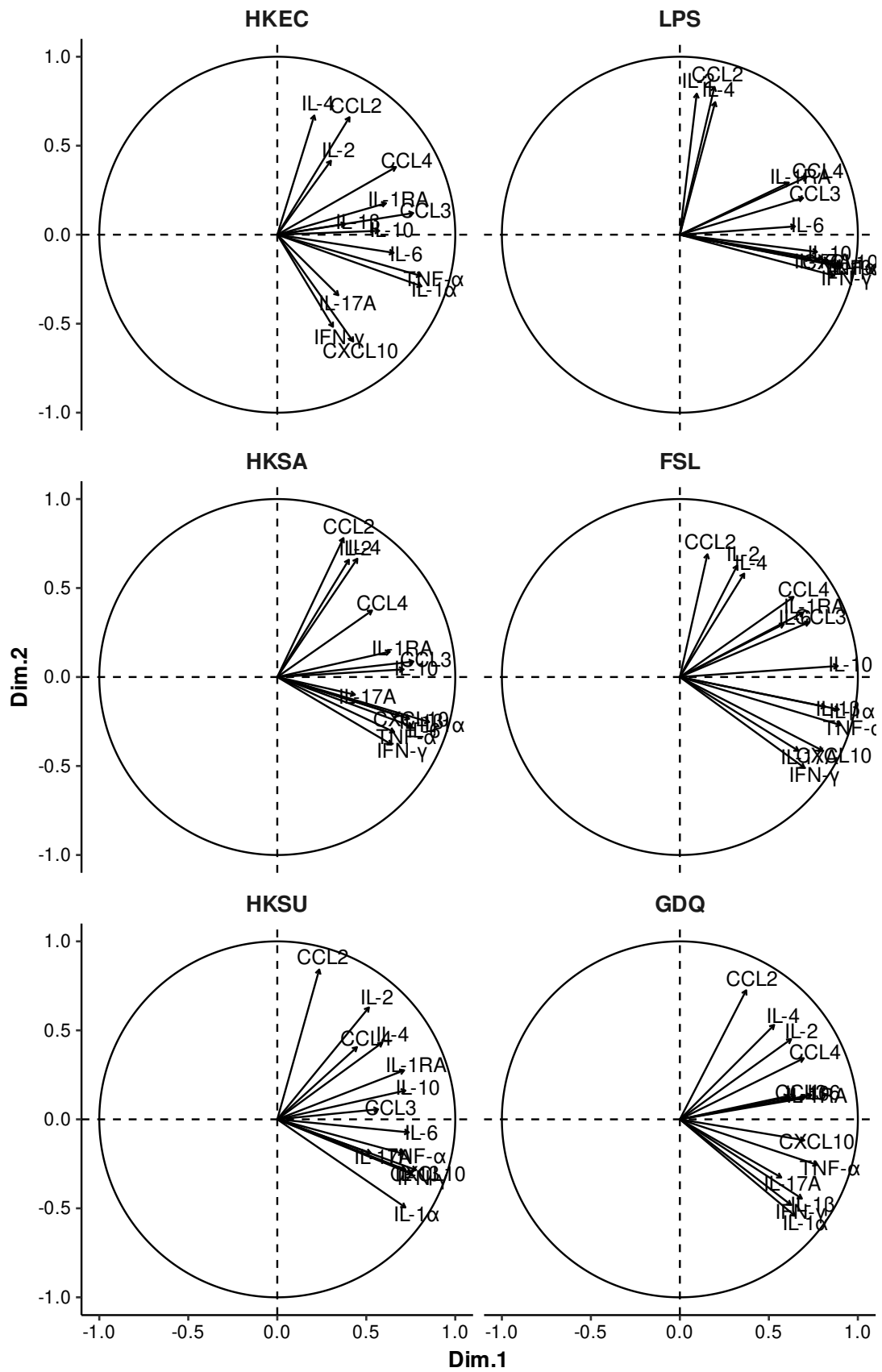


FIGURE 8. : Cercles des corrélations relatifs aux ACP conduites sur les valeurs delta des cytokines.

