

## Identification et caractérisation d'une mutation dans le gène SOCS2 (Suppressor Of Cytokine Signalling 2) associée à la sensibilité aux mammites chez les ovins laitiers

RUPP R. (1), FOUCRAS G. (2), SENIN P. (3), SARRY J. (1) ALLAIN C. (1), PORTES D. (4), BOUCHEZ O. (1), TOSSER-KLOPP G. (1)

(1) INRA, UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage, F-31326 Castanet-Tolosan, France

(2) INRA-ENVT, UMR1225 Interactions Hôtes-Agents Pathogènes, F-31076 Toulouse, France

(4) INRA, Sigenae, F-31326 Castanet-Tolosan, France

(5) INRA, UE0321 Domaine de La Fage, F-12250 Roquefort sur Soulzon, France

### RESUME

Les mammites sont principalement liées à des infections de la glande mammaire par diverses bactéries. L'existence d'une variabilité génétique naturelle de la résistance des ruminants laitiers aux mammites a été largement établie, mais les gènes sous-jacents restent majoritairement inconnus. Dans cet article, nous rapportons les résultats de détection, de cartographie fine et de caractérisation fonctionnelle d'un variant génétique associé à la prédisposition aux mammites chez les ovins laitiers. En premier lieu, une analyse d'association basée sur le génotypage de 1009 béliers avec la puce Illumina 50K OvineSNP50Beadchip a permis d'identifier une région QTL, associée à des concentrations de cellules somatiques (CCS) élevées, sur le chromosome ovine OAR3. La cartographie fine de la région basée sur le séquençage complet de 3 animaux chez qui les allèles ségrégeaient a permis d'identifier un SNP candidat localisé dans la séquence codante d'un gène hautement conservé dans le règne animal, *Suppressor Of Cytokine Signaling 2* (*Socs2*). La fréquence de l'allèle associé à des CCS élevées est de 21,7% et le « génotype *Socs2* » explique 12% de la variance du caractère dans la population où il a été identifié. La mutation induit une substitution R96C dans le domaine fonctionnel SH2 de SOCS-2, le site de fixation de la protéine à de nombreux ligands tels que le récepteur à l'hormone de croissance (GHR). À l'aide d'un test fonctionnel basé sur la résonance des plasmons de surface, nous avons montré que la mutation R96C abroge l'affinité de SOCS-2 pour la tyrosine phosphorylée du domaine intracellulaire de GHR. Par ailleurs, nous avons montré que la croissance et la taille à l'âge adulte des brebis portant l'allèle muté étaient supérieures à celles des brebis de génotype sauvage, en adéquation avec l'hypothèse d'une invalidation de la fonction de SOCS-2. De plus, la mutation est également associée à une production laitière supérieure. L'ensemble de ces résultats conforte le fait que la mutation identifiée est probablement responsable du QTL pour les CCS sur OAR3. Ces résultats suggèrent un rôle de SOCS-2 dans le contrôle de l'inflammation médié par la voie de signalisation JAK/STAT et suggèrent un potentiel effet pléiotropique de cette mutation sur la croissance et les caractères de production.

## Identification and characterization of a mutation in the SOCS2 gene (Suppressor Of Cytokine Signalling 2) associated with susceptibility to mastitis in dairy sheep

RUPP R. (1), FOUCRAS G. (2), SENIN P. (3), SARRY J. (1) ALLAIN C. (1), PORTES D. (4), BOUCHEZ O. (1), TOSSER-KLOPP G. (1)

(1) INRA, UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage, F-31326 Castanet-Tolosan, France

### SUMMARY

Mastitis is an infectious disease mainly caused by bacteria invading the mammary gland. Genetic control of susceptibility to mastitis has been widely evidenced in dairy ruminants, but the genetic basis and underlying mechanisms are still largely unknown. We describe here the discovery, fine mapping and functional characterization of a genetic variant associated with mastitis in dairy sheep. After implementing genome-wide association studies, we identified a major QTL associated with an elevated milk leukocyte count on ovine chromosome OAR3. Fine mapping of the region, using full sequencing of the genomes of three animals with a 12X coverage, provided one strong SNP candidate that mapped to the coding sequence of a highly conserved gene, *suppressor of cytokine signaling 2* (*Socs2*). The frequency of the allele associated with increased susceptibility to mastitis was 21.7% and the *Socs2* genotype explained 12% of the variance of the trait. The point mutation induces the R96C substitution in the SH2 functional domain of SOCS2, i.e. the binding site of the protein to various ligands, as well-established for the growth hormone receptor GHR. Using surface plasmon resonance we show that the R96C point mutation completely abrogated SOCS2 binding affinity for the phosphopeptide of GHR. Additionally, the body size, body weight and milk production in R96C homozygote sheep, were significantly increased by 24%, 18%, and 4.4%, respectively, when compared to wild type sheep, supporting the view that the point mutation causes a loss of SOCS-2 functional activity. Altogether these results provide strong evidence for a causal mutation controlling mastitis in sheep and highlight the major role of SOCS-2 as a tradeoff between the host's inflammatory response to mammary infections, and body growth and milk production, which are all mediated by the JAK/STAT signaling pathway.

## INTRODUCTION

Les mammites sont principalement causées par l'infection de la glande mammaire par diverses bactéries. L'existence d'une variabilité génétique naturelle de la résistance des ruminants laitiers a été largement établie. Ces résultats portent essentiellement sur l'analyse à grande échelle d'un critère indirect, la concentration de cellules somatiques du lait (CCS), témoin indirect de l'inflammation de la glande en réponse à l'intrusion d'agents pathogènes. L'héritabilité des CCS, autour de 15-20%, est sensiblement plus élevée que celle des cas de mammites cliniques qui est inférieure à 10% (revue dans Rupp et Foucras, 2010). A ce jour, les gènes sous-jacents restent majoritairement inconnus. En effet, bien que de nombreux QTL aient été rapportés (revue dans Rupp et Foucras, 2010), seul un QTL a été complètement caractérisé à ce jour (Sujimoto *et al.*, 2006).

Dans cet article, nous rapportons les résultats de détection, de cartographie fine et de caractérisation fonctionnelle d'un variant génétique associé à la prédisposition aux mammites en ovins laitiers.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1 DETECTION DE QTL ET CARTOGRAPHIE FINE

Les analyses de liaison et d'association ont porté sur le génotypage avec la puce Illumina 50K OvineSNP50Beadchip d'une population de 1009 béliers de race Lacaune répartis en 33 familles de demi-frères. Le phénotype est la déviation des filles (DYD) pour le caractère CCS, après transformation logarithmique puis moyenné par lactation (LSCS). Le DYD est la performance moyenne des filles d'un bélier, corrigée pour les effets environnementaux. La détection de QTL a été conduite par une analyse de liaison (LA) ainsi que par une analyse d'association (LD) à l'aide du logiciel QTLmap (Elsen *et al.*, 1999). L'intervalle de confiance des QTL a été estimé par la méthode log drop-off du logiciel QTLmap. Après un contrôle qualité, un total de 41 501 SNPs, répartis sur les autosomes OAR1 à OAR26, ont contribué aux analyses.

Pour la cartographie fine, le séquençage génomique complet à une profondeur moyenne de 12X a été réalisé pour un trio de béliers. Le trio incluait un père ségrégeant au QTL (Qq) ainsi que deux de ses fils extrêmes sur le phénotype CCS et homozygotes pour les allèles alternatifs du QTL (QQ et qq). Les haplotypes Q et q ont été déterminés sur la base des 4 SNP encadrant la localisation la plus probable du QTL (sur une longueur de 416 kb). Les séquences ont été alignées sur le génome de référence *Ovis aries* v3.1 (Archibald *et al.*, 2010) avec le logiciel BWA (Li *et al.*, 2009). La recherche de SNP et d'insertions/délétions a été réalisée sur l'ensemble des séquences simultanément. Les variants ont été annotés selon leur fonction (synonymes, non synonymes, etc.) à l'aide de snpEFF et snpSIFT (Cingolani *et al.*, 2012).

### 1.2. TEST FONCTIONNEL

Pour la vérification de l'expression du gène et la production des deux variants protéiques sous forme recombinante, les séquences codantes sauvage (WT) et mutée (R96C) ont été clonées par PCR à partir de cellules sanguines (PBMC) d'une brebis hétérozygote. Les produits de PCR ont été sous-clonés dans le plasmide pCR2.1, avant vérification par séquençage de type Sanger. Les séquences des deux variants ont été transférées dans des vecteurs d'expression procaryotes contenant les étiquettes Thioredoxin et 6xHis-tag. Après expression dans la souche *E. coli* BL21, les protéines ont été purifiées par chromatographie d'affinité.

La mesure de l'affinité des protéines WT et mutée a été réalisée à l'aide d'un test basé sur la résonance plasmonique de surface (système Biacore). Une analyse réalisée en un seul cycle a permis de déterminer les constantes d'association, de dissociation et d'affinité de liaison (respectivement  $k_a$ ,  $k_d$ , and

KD) en injectant des concentrations croissantes des protéines (100 nM–8,1  $\mu$ M).

## 1.2 CARACTERISATION DE L'EFFET D'UNE MUTATION SUR LA PRODUCTION LAITIÈRE, LA CROISSANCE ET LA TAILLE

Un test de génotypage (test KASPar) a été mis au point pour caractériser le SNP causal potentiel C/T. Ce test a été utilisé pour génotyper un total de 468 béliers de la population de découverte du QTL et étudier l'effet de la mutation sur les caractères de production laitière (DYD pour le lait, TP et TB).

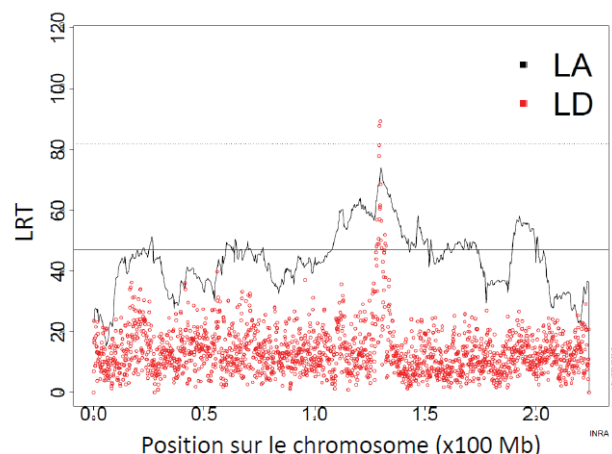
Par ailleurs, un groupe de 18 brebis des 3 génotypes (6 C/C, 6 C/T et 6 T/T) a été produit à l'Unité Expérimentale INRA de La Fage (ROQUEFORT SUR SOULZON, France). Les brebis, nées entre 2010 et 2012, étaient appariées en fonction de leur origine paternelle. Le poids a été mesuré à 12 reprises dans les 3 années suivant leur naissance. L'évaluation de la taille à l'âge adulte a fait l'objet de 14 mesures de morphométrie en octobre 2013.

Les données de production laitière, poids et taille ont été analysées à l'aide de modèles linéaires mixtes avec le logiciel SAS (SAS Institute, Cary, NC) en incluant les effets fixes du génotype, du père, de l'âge à la mesure (morphométrie), de l'année de naissance (poids), et l'effet aléatoire de l'animal pour les données répétées de poids.

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. DETECTION ET CARTOGRAPHIE FINE D'UN QTL HAUTEMENT SIGNIFICATIF SUR LE CHROMOSOME OAR3

Sept QTL pour le LSCS ont été détectés par LA sur les chromosomes OAR3, 8, 10, 11, 14, 16 et 20 au seuil de 5% à l'échelle du chromosome. Beaucoup d'autres QTL ont été détectés en LD, avec un résultat particulièrement significatif ( $p < 0.1\%$ ) sur le chromosome OAR3 parfaitement concordant avec la position obtenue en LA (Figure 1). Les deux approches, LA et LD, ont également donné des résultats concordants sur le chromosome 11. Signalons que parmi les nombreux 'QTL mammites' décrits chez les bovins laitiers (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb>), un QTL correspond à une région synténique sur le chromosome BTA5 pour les CCS et les mammites cliniques.



**Figure 1** : Profil du test rapport de vraisemblance (LRT) pour le caractère LSCS sur le chromosome OAR3 en analyse de liaison (LA) et d'association (LD).

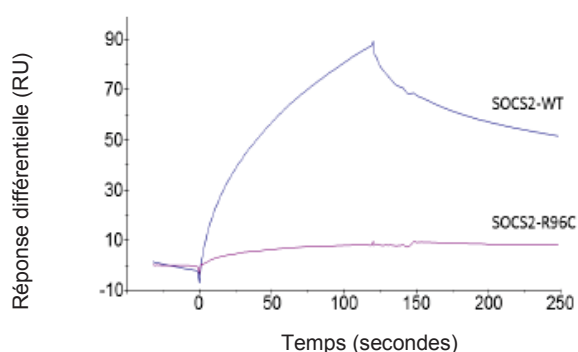
Le séquençage du trio de béliers (père Qq et fils qq et QQ), a généré entre 379 et 400 millions de séquences par run, en fonction de l'animal. L'intervalle de confiance du QTL était de 200 kb. La zone élargie à 500Kb analysés contenait 1543

SNPs, dont 200 étaient concordants avec le génotype attendu : hétérozygote chez le père et homozygote pour les allèles alternatifs chez les fils. Parmi ces 200 SNP, 1 seul SNP se trouvait dans la région codante du gène *Socs2* (*Suppressor of cytokine signaling 2*), 2 SNPs étaient dans la région 3'UTR du gène *Cradd* (CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain) et les autres SNP étaient dans des régions introniques ou intergéniques.

Le SNP dans la région codante de *Socs2* implique un changement non synonyme d'acide aminé (R96C) dans une région du gène hautement conservée entre les espèces. Cette région code le site de fixation de la protéine à ses ligands. L'ensemble de ces éléments font de ce SNP un candidat causal de choix pour le QTL de OAR3. Il s'agirait d'une mutation impliquant une sensibilité accrue, puisque le bélier résistant (CCS faibles) portait l'allèle sauvage.

## 2.1. MESURE DE L'AFFINITE DES FORMES SAUVAGE ET MUTÉE DE LA PROTEINE SOCS-2

La protéine SOCS-2 interagit avec des récepteurs endogènes tels que le récepteur de l'hormone de croissance, GHR (Bullock *et al.*, 2006). L'affinité de la protéine SOCS-2 pour le phosphopeptide de GHR, mesurée avec le test Biacore, était notablement différente entre la forme sauvage (WT) et la forme mutée (R96C) (Figure 2). La mutation diminue considérablement l'affinité de SOCS-2 pour son ligand (au moins GHR) ce qui est compatible avec la position de la mutation et son rôle dans la structure du site de liaison de la protéine aux ligands.



**Figure 2 :** Mesure de la liaison des deux variants de la protéine sur le phosphopeptide de GHR en temps réel. L'analyse de la liaison a été réalisée en immobilisant le peptide de GHR et son peptide contrôle de séquence aléatoire sur le support à la concentration finale de 800 nM. Le sensorgramme présente la réponse différentielle, après soustraction de la référence, en unités de résonance (RU) en fonction du temps.

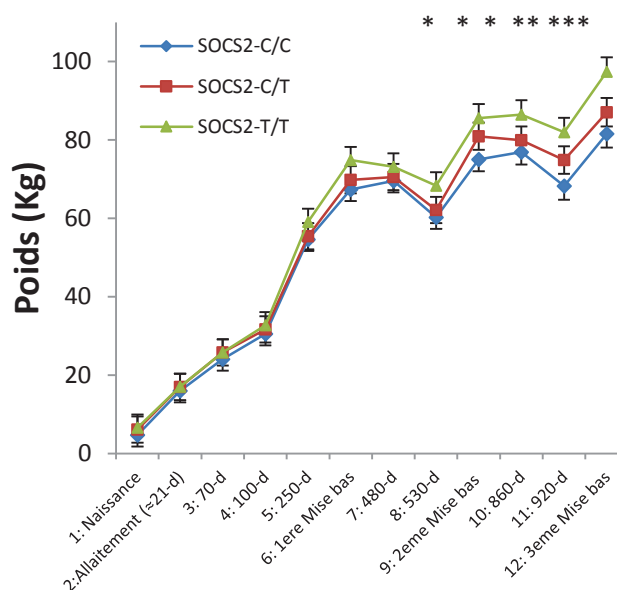
## 2.3 EFFET DE LA MUTATION SUR LE LSCS ET SUR LA PRODUCTION LAITIÈRE

La fréquence de la mutation (T) était de 21,7% dans la population des 468 béliers génotypés à l'aide du test KASPar. Les fréquences des génotypes sauvages (C/C), hétérozygotes (C/T) et homozygotes (T/T) étaient respectivement de 58,5%, 40% et 1,5%. L'analyse de variance a confirmé que la mutation est associée à une augmentation très significative ( $p < 0,001$ ) du LSCS, ce SNP expliquant 12% de la variance du caractère.

Cette fréquence élevée, alors qu'elle est défavorable, pourrait être expliquée par un avantage sur d'autres caractères d'intérêt. En accord avec cette hypothèse, la mutation était associée à une production laitière significativement ( $p < 0,05$ ) plus élevée, soit +4,4% de la descendance femelle des béliers T/T par rapport à celle des béliers C/C.

## 2.4 EFFET DE LA MUTATION SUR LA CROISSANCE ET LA TAILLE

Metcalf *et al.* (2000) ont montré que les souris invalidées pour le gène *Socs2* présentaient un phénotype de gigantisme. De façon concordante, l'analyse de la courbe de croissance des 18 brebis des trois génotypes différents de *Socs2*, a montré que le poids des brebis porteuses de la mutation à l'état homozygote était largement supérieur ( $p < 0,05$ ) à celui des brebis de génotype sauvage à partir de la fin de la première lactation (Figure 3). La différence moyenne entre TT et CC atteignait 16 kg à l'âge de 3 ans, soit une différence équivalente à 18% du poids moyen. Cette observation est en accord avec l'hypothèse que la mutation induit une perte de fonction de la protéine SOCS-2 qui perturbe la voie de signalisation de GHR et la voie de signalisation JAK/STAT, comme cela a été décrit chez la souris.



**Figure 3 :** Effet du génotype *Socs2* (moyenne des moindres carrés  $\pm$  écart type d'erreur) sur le poids mesuré chez 18 brebis pendant 3 ans.

(Différence entre TT et CC : \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )

De façon similaire, le génotype *Socs2* était significativement associé à une variation des mesures de la taille et de diverses mensurations réalisées sur les 18 brebis (Tableau 1). Les brebis mutées étaient de plus grande taille, de 9,2% en moyenne, avec une différence maximale de 24% pour la hauteur mesurée à la pointe des coudes entre brebis homozygotes sauvages et mutées.

La mutation semble avoir un effet positif additif à la fois sur le poids et la taille des animaux, les phénotypes des brebis CT étant généralement intermédiaires entre ceux des brebis CC et TT. A notre connaissance, c'est le premier exemple publié d'une mutation ayant des effets pléiotropes qui identifie une molécule clé comme un « trade off » (ou compromis) entre un caractère de santé et des caractères de production. Ce résultat peut, en partie tout du moins, expliquer la corrélation génétique négative entre quantité de lait et CCS, égale à 0,18 en première lactation dans cette population de brebis laitières (Rupp *et al.*, 2009). De telles oppositions génétiques ont été largement publiées pour les bovins laitiers (Revue par Rupp et Foucras, 2010), soutenant l'hypothèse que la sélection sur la production laitière durant les dernières décennies a probablement abouti à la détérioration de la résistance aux mammites. L'opposition génétique entre santé et production causée par ce type de variants génétiques ne pourra donc pas être contournée par une sélection conventionnelle ou assistée par SNP. Il faudra donc raisonner la diminution de la fréquence de telles mutations en fonction de la perte de gain génétique sur la production à laquelle on consent.

**Tableau 1** : Effet du génotype *Socs2* (moyenne des moindres carrés ± écart type d'erreur) sur 14 mesures de taille réalisées chez 18 brebis.

(Les différentes lettres (a,b) montrent les différences significatives entre génotypes à  $p < 0,05$ )

Caractère	P-Value	Génotype <i>Socs2</i>							
		C/C (Ismeans ± e.t)		C/T (Ismeans ± e.t)		T/T (Ismeans ± e.t)			
M1	Circonférence thorax (aux coudes)	0,669	106,9	± 2,0	108,7	± 2,2	109,2	± 2,2	
M2	Circonférence thorax (hypocondrium)	0,140	124,5	± 1,9	130,0	± 2,1	129,3	± 2,1	
M3	Hauteur au garrot	0,008 **	68,3	a ± 1,1	70,3	a ± 1,2	<b>73,9</b>	b ± 1,2	
M4	Hauteur au sacrum	0,024 *	71,8	a ± 1,5	75,5	a,b ± 1,7	<b>78,6</b>	b ± 1,7	
M5	Hauteur au jarret	0,018 *	27,5	a ± 0,4	28,7	a,b ± 0,5	<b>29,7</b>	b ± 0,5	
M6	Hauteur au coude	0,011 *	39,9	a ± 2,1	<b>47,2</b>	b ± 2,3	<b>51,0</b>	b ± 2,3	
M7	Largeur de poitrine	0,022 *	18,8	a,b ± 0,7	17,4	a ± 0,8	<b>20,2</b>	b ± 0,8	
M8	Largeur entre la pointe des coudes	0,582	21,2	± 0,8	20,7	± 0,9	21,7	± 0,9	
M9	Largeur entre les ischions	0,029 *	14,7	a ± 0,3	15,2	a ± 0,3	<b>16,0</b>	b ± 0,3	
M10	Largeur entre la pointe des hanches	0,018 *	24,2	a,b ± 0,4	25,0	a ± 0,5	<b>23,1</b>	b ± 0,5	
M11	Longueur abdominale thoraco	0,064	85,3	± 1,8	89,8	± 2,0	92,0	± 2,0	
M12	Longueur Humérus	0,220	24,0	± 1,3	22,6	± 1,5	25,4	± 1,5	
M13	Longueur Fémur	0,191	20,5	± 0,5	20,3	± 0,5	21,3	± 0,5	
M14	Longueur tibia	0,019 *	24,8	a ± 0,8	<b>27,8</b>	b ± 0,8	<b>28,4</b>	b ± 0,8	

## CONCLUSION

Nous avons identifié une mutation dans le gène *Suppressor of cytokine signaling 2 (Socs2)* qui est très probablement la mutation causale expliquant un QTL pour les CCS dans un modèle ovin laitier.

La mutation identifiée modifie un acide aminé (R96C) dans le domaine SH2 de la protéine SOCS-2 et diminue considérablement l'affinité de la protéine pour ses ligands naturels, dont le récepteur de l'hormone de croissance. Bien que les mécanismes par lesquels SOCS-2 modifie la réponse de l'hôte ne soient pas connus, ces résultats suggèrent un rôle de SOCS-2 dans le contrôle de l'inflammation médié par la voie de signalisation JAK/STAT. Ces résultats ouvrent la voie à des études détaillées pour mieux comprendre l'effet de SOCS-2 sur l'immunité et la résistance aux infections bactériennes.

La mutation, associée à une plus grande sensibilité aux mammites, était par ailleurs également associée à de meilleures performances de production laitière et un gabarit plus élevé des animaux. Ceci suggère un effet pléiotrope de la mutation dû probablement à l'absence de rétrocontrôle des

voies de signalisation de l'hormone de croissance et de la prolactine. SOCS-2 apparaît donc comme un facteur de « trade off » entre caractères de production et de résistance aux maladies. La gestion de cette information doit être optimisée dans les programmes de sélection afin de résoudre au mieux le conflit entre l'augmentation de la production et l'amélioration de la santé et la robustesse des animaux.

Ce travail a bénéficié du support financier du projet ANR « SheepSNPQTL » avec le soutien d'APISGENE et du projet européen « Sustainable Solutions for Small Ruminants ».

Archibald AL *et al.*, 2010. Anim Genet. 41(5):449-53.  
 Bullock AN *et al.*, 2006. Proc Natl Acad Sci 103(20):7637-42  
 Cingolani *et al.*, 2012. Front Genet;3:35.  
 Elsen J.M. *et al.*, 1999. Genet. Sel. Evol. 31:213-224  
 Li H, Durbin R, 2009. Bioinformatics 25(14):1754-60.  
 Metcalf D *et al.*, 2000. Proc Natl Acad Sci 97(16):9174-9.  
 Rupp R *et al.*, 2009. J Dairy Sci. 92(3):1203-19.  
 Rupp R, Foucras G., 2010. In Bishop SC, Axford RFE, Nicholas FW, Owen JB. Breeding for Disease Resistance in Farm Animals: CABI; 2010  
 Sugimoto M. *et al.*, 2006. Proc Natl Acad Sci 103, 6454-6459.