

Identification de régions du génome et de gènes candidats associés au niveau de réponse immune innée de veaux Holstein

MARTIN P. (1), JOUANEAU L. (2), TAUSSAT S. (3), VINET A. (1), LEFEBVRE R. (1), DESCAMPS D. (2), FERRET C. (2), CHOTTIN C. (2), PIETRALUNGA V. (2), PEZIER T. (4), LACROIX-LAMANDE S. (4), BOUSSAHA M. (1), BARBEY S. (5), DENIZOT V. (6), BOICHARD D. (1), RIFFAULT S. (2), LAURENT F. (4)

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

(2) Université Paris-Saclay, INRAE, UVSQ, VIM, 78350, Jouy-en-Josas, France

(3) Alice, 149 rue de Bercy, 75012, Paris, France

(4) INRAE, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, 37380 Nouzilly, France

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

(6) Innoval, GDS Bretagne, 35538 Noyal-sur-Vilaine, France

RESUME

Afin d'étudier le contrôle génomique de la réponse immune innée, les concentrations de 14 cytokines ont été déterminées grâce à un kit multiplex dans quatre échantillons de sang pour chacun des 623 veaux Holstein du projet HealthyCalf. Trois de ces échantillons avaient été mis au contact d'agonistes mimant l'exposition à des pathogènes et le dernier mesurait les niveaux de cytokines présents à l'état basal. L'effet de l'immunostimulant et les relations entre les concentrations cytokiniques ont été étudiés par une analyse en composantes principales, puis des analyses d'association tout génome 50k ont été effectuées. Les résultats montrent que les niveaux de la plupart des cytokines sont très associés les uns aux autres avec un premier axe de l'ACP qui explique plus de 70% de la variabilité. Ce même axe discrimine la condition de stimulation. De plus, 40 régions du génome ont été identifiées comme associées à au moins un caractère, dont certaines sont largement partagées entre plusieurs cytokines. Sept gènes de ces régions ont déjà été associés à la réponse immune innée dans d'autres espèces.

Identification of genome regions and promising candidate genes associated to innate immune capacity on young Holstein calves

MARTIN P. (1), JOUANEAU L. (2), TAUSSAT S. (3), VINET A. (1), LEFEBVRE R. (1), DESCAMPS D. (2), FERRET C. (2), CHOTTIN C. (2), PIETRALUNGA V. (2), PEZIER T. (4), LACROIX-LAMANDE S. (4), BOUSSAHA M. (1), BARBEY S. (5), DENIZOT V. (6), BOICHARD D. (1), RIFFAULT S. (2), LAURENT F. (4)

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

SUMMARY

In order to investigate the genomic control of innate immune response, the concentration levels of 14 cytokines produced naturally or in response to whole blood stimulation with three pattern recognition receptor agonists were determined in 623 Holstein calves enrolled in the HealthyCalf project. The effect of the immunostimulants and the relationship among the cytokines produced were observed through a principal component analysis, and 50K GWAS were performed on all cytokine x condition traits. Results showed that most cytokines present a general common pattern following the first component that explained 70% of the variability and partially discriminated the agonistic conditions. Additionally, 40 genome regions were found associated with at least one trait with some regions being largely shared between conditions and cytokines. Seven positional candidate genes were considered as especially interesting due to their functional link to innate immune response reported from the literature.

INTRODUCTION

Réduire la mortalité des veaux est un enjeu majeur pour les éleveurs. En France, suivant la race, 10 à 20% des veaux n'atteignent pas l'âge de 6 mois (Leclerc et al., 2016). Outre les vêlages difficiles et la mortinatalité, les maladies diarrhéiques et respiratoires sont les causes principales de mortalité des jeunes animaux (Jegou et al., 2006). Si la conduite d'élevage et la maîtrise sanitaire peuvent limiter l'incidence de ces pathologies, la génétique des animaux, quant à elle, constitue un autre levier à exploiter. Depuis le début des années 2000, la mortinatalité a fait l'objet d'une évaluation génétique, tant pour les effets directs que maternel, et un certain nombre de caractères de santé ont fait leur entrée dans les programmes de sélection (Miglior et al., 2017). Concernant les maladies infectieuses, seules les mammites sont prises en compte en sélection et ce type de pathologie des adultes est plus souvent lié à l'immunité acquise des animaux. La recherche s'est en revanche pour l'instant très peu intéressée à l'immunité innée aspécifique, déterminante pour la résistance aux pathologies des très jeunes. C'est dans ce contexte qu'a été construit le projet HealthyCalf, financé par

APIS-GENE (<https://www.apis-gene.com/>). Ce projet vise à l'identification de marqueurs prédictifs de résistance accrue aux pathogènes provoquant des maladies diarrhéiques et respiratoires, en proposant entre autres une méthode robuste de phénotypage de la compétence immunitaire innée des veaux. Ce phénotypage se base sur la capacité des cellules immunitaires à réagir à des ligands naturels ou synthétiques mimant l'exposition à des pathogènes (PAMP, pour Pathogen Associated Molecular Pattern) et à sécréter des médiateurs protéiques comme les cytokines et les chimiokines. L'objectif de cette étude est d'explorer les résultats de cette nouvelle méthode de phénotypage afin de caractériser la réponse immunitaire innée des veaux à des immunostimulants et l'éventuelle existence de profils types bon ou moins bon répondeurs. Il s'agira ensuite de rechercher les régions du génome associées aux cytokines pour mieux connaître leur déterminisme, savoir s'il existe ou non des régions partagées et mieux cerner les mécanismes biologiques impliqués si des gènes candidats sont identifiés.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. PRELEVEMENTS

Entre 2018 et 2021, un large dispositif de mesure de la réponse immune des jeunes veaux Holstein a été mis en place, à la fois dans un réseau de fermes commerciales volontaires de Bretagne et dans la ferme expérimentale INRAE du Pin-au-Haras (Normandie). C'est au total 623 veaux qui ont été prélevés entre une et deux semaines d'âge par des vétérinaires ou des techniciens qualifiés. Pour chaque veau, quatre échantillons sanguins étaient collectés au niveau de la jugulaire à l'aide de seringues Monovette (Sarstedt, Marnay, France) contenant de l'héparine. De plus, trois de ces seringues contenaient un type différent de ligands synthétiques PAMP (pour Pathogen Associated Molecular Pattern) afin de mimer l'exposition à certains types de pathogènes (Lesueur et al, 2022). Ces trois types d'immunostimulants étaient le LPS (lipopolysaccharides, composant majeur de la membrane externe des bactéries Gram négatives), le NOD2L (ligand de NOD2, un récepteur de l'hôte impliqué dans la reconnaissance du peptidoglycane de la paroi bactérienne) et le R848 (pour Resiquimod, un ligand synthétique mimant les ARN Simple brin de certains virus). La quatrième seringue ne contenait aucun immunostimulant et servait de condition témoin, afin de connaître le niveau basal des animaux.

Tous les échantillons ont été incubés à 38,5°C pendant 24h puis le plasma a été stocké à -20°C en attente du dosage qui avait lieu en fin de saison de prélèvement. Un échantillon supplémentaire de sang (ou de cartilage en cas de veaux jumeaux) était également collecté à des fins de génotypage des animaux.

1.2. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION DES CYTOKINES

Les concentrations de 15 cytokines/chimiokines (IFN- γ , IL-1 α et IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17a, IP-10, CCL2, CCL3, CCL4 and TNF α) ont été déterminées dans chacun des échantillons de plasma sanguin grâce à un kit commercial bovin MILLIPLEX® personnalisé (SPRCUS706, Merck, Millipore). Ce kit mesure des chimiokines impliquées dans l'attraction des cellules immunitaires (IP-10/CXCL10 ; CCL2, CCL3, CCL4) et des cytokines dont la plupart sont impliquées dans les réactions inflammatoires (IFN- γ , IL-1 α et IL-1 β , IL-6, IL-17a, and TNF α). L'IFN- γ gamma est aussi une cytokine particulièrement importante dans le contrôle des agents pathogènes intracellulaires. Les concentrations en cytokines/chimiokines étaient mesurées avec un MAGPIX® via le logiciel xPONENT® (Luminex). Ce système permet de doser de manière concomitante l'ensemble des cytokines sur un grand nombre d'échantillons. Néanmoins, la standardisation du dosage imposait que tous les échantillons (et toutes les cytokines) soient dosés à un niveau unique de dilution (généralement 1/10), ce qui impliquait une gamme de validité unique dans laquelle les concentrations pouvaient être déterminées. Lorsqu'un échantillon présentait une concentration en dehors de la gamme pour une cytokine donnée (trop concentré ou pas assez concentré), la borne correspondante (maximum ou minimum respectivement) de la gamme lui était automatiquement assignée pour cette cytokine. Pour IL-8, plus de la moitié des échantillons étaient hors de la gamme (haute) et cette cytokine a ainsi été retirée des analyses. Pour les 14 autres, le taux d'assignation variait entre 1 et 22% des échantillons.

1.3. GENOTYPAGES ET CONTRÔLES QUALITE

Tous les animaux du dispositif ont été génotypés sur la puce moyenne densité EuroGMD (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). L'extraction d'ADN et le génotypage ont été réalisés au

laboratoire LABOGENA (www.labogena.fr, Jouy-en-Josas, France). Différents contrôles qualité ont ensuite été appliqués : au moins 95% de marqueurs typés par individu, au moins 90% des individus typés sur un marqueur donné, une fréquence minimale de l'allèle mineur de 2% et l'absence de déséquilibre de Hardy-Weinberg ($P > 10^{-4}$). Après ces contrôles, un total de 573 animaux et 46 910 SNP répartis sur les 29 autosomes ont été validés.

1.4. ANALYSES STATISTIQUES

Avant toute analyse statistique, l'ensemble des concentrations cytokiniques ont été exprimées en base logarithmique ($\log_2$) pour obtenir une distribution plus conforme aux méthodes utilisées.

Dans un premier temps, pour visualiser l'effet de la condition de stimulation (LPS, NOD2L, R848 ou témoin), ainsi que la relation entre les 14 cytokines, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur l'ensemble des échantillons en utilisant le package MiXOmics de R (Rohart et al., 2017).

Dans un second temps, afin de déterminer l'existence d'éventuels contrôles génomiques de la concentration de certaines cytokines, une analyse d'association tout génome (GWAS) a été effectuée. Pour cela, chacune des 4 conditions de stimulation pour chacune des 14 cytokines a été considérée comme un caractère différent. De plus, les projections de chacun des individus pour chaque condition sur les deux principaux axes de l'ACP ont été ajoutées comme 8 caractères supplémentaires, portant le total de caractères analysés à 64. Pour chaque caractère, l'effet de chaque SNP a été testé par l'application du modèle linéaire suivant en utilisant le logiciel GCTA (option mlma) :

$$y = 1\mu + xb + u + e$$

où y représente le vecteur des phénotypes, μ correspond à la moyenne, b est l'effet fixe additif du SNP dont l'association est testée et x le vecteur des génotypes au SNP (de 0 à 2), $u \sim N(0, G\sigma_u^2)$ est le vecteur des effets aléatoires polygéniques (G étant la matrice d'apparentement génomique et σ_u^2 la variance polygénique estimée dans le modèle nul), et $e \sim N(0, I\sigma_e^2)$ représentant le vecteur des effets aléatoires résiduels (I étant la matrice identité et σ_e^2 la variance résiduelle). Dans le cadre de cette étude préliminaire, les effets SNP avec une probabilité de test inférieure à 10^{-5} ($-\log_{10}(P) > 5$) ont été considérés comme significatifs, ce qui correspond globalement au seuil chromosomique d'une correction de Bonferroni avec un niveau α de 5%.

2. RESULTATS

2.1. STATISTIQUES DESCRIPTIVES

Les statistiques élémentaires des concentrations obtenues pour les 14 cytokines dans la condition témoin (sans immunostimulation) sont présentées dans le tableau 1. On constate, en plus de la très forte variabilité attendue des concentrations entre cytokines, que la variabilité existe également entre les différents individus pour une cytokine donnée. Les écart-types sont ainsi importants au regard des moyennes, avec des coefficients de variation allant de 53% (pour IL4) à plus de 1400% (pour CCL4). En présence d'un immunostimulant, ce constat de variabilité entre cytokines et entre individus reste le même mais avec des niveaux de concentration généralement plus élevés. On observe en effet une augmentation moyenne de 350% des concentrations cytokiniques en présence de LPS, 208% en présence de NOD2L et plus de 2000% en présence de R848. Il est à noter que dans quelques cas, l'ajout de l'immunostimulant fait baisser la concentration moyenne d'une cytokine donnée (CCL2 pour R848, IFN γ pour LPS et NOD2L, et IL17A pour

LPS) mais cela peut résulter de disparités entre animaux où quelques individus aux concentrations particulièrement élevées en condition témoin voient leur concentration chuter avec l'immunostimulant et masquent ainsi le comportement majoritaire de leurs congénères qui lui est à l'augmentation (cas d'IFN γ notamment). Enfin, la concentration moyenne en IL4 semble très peu sensible à la présence d'un

immunostimulant (variation égale ou inférieure à 2%). Ceci n'est pas très surprenant car cette cytokine est plutôt associée à la réponse immunitaire adaptative.

Cytokine	Moyenne (pg.ml-1)	Ecart-type (pg.ml-1)	Min. (pg.ml-1)	Max. (pg.ml-1)	Imputation (%)
CCL2	169956	458431	196	1650000	8,7
CCL3	4764	9050	87	70967	7,4
CCL4	4,2*10 ⁹	6*10 ¹⁰	36	8*10 ¹¹	0,7
IFN γ	4651	38667	0,4	453705	0,7
IL10	618	796	1,6	9404	4,5
IL17A	26	124	0,05	1869	15,9
IL1RA	47082	68051	21	391018	2,2
IL1 α	77	218	0,1	4210	13,8
IL1 β	1649	5572	4,4	76354	22,5
IL2	482	1204	31,7	24571	33,4
IL4	4154	2226	90	11024	3,9
IL6	108	77	0,08	668	3,4
IP10	2952	15384	42	169727	1
TNF α	2705	8794	5,0	202940	6,7

Tableau 1 Concentration moyenne, écart-type, minimum et maximum pour chacune des 14 cytokines dans la condition témoin, ainsi que le pourcentage de valeurs imputées car hors de la gamme de validité

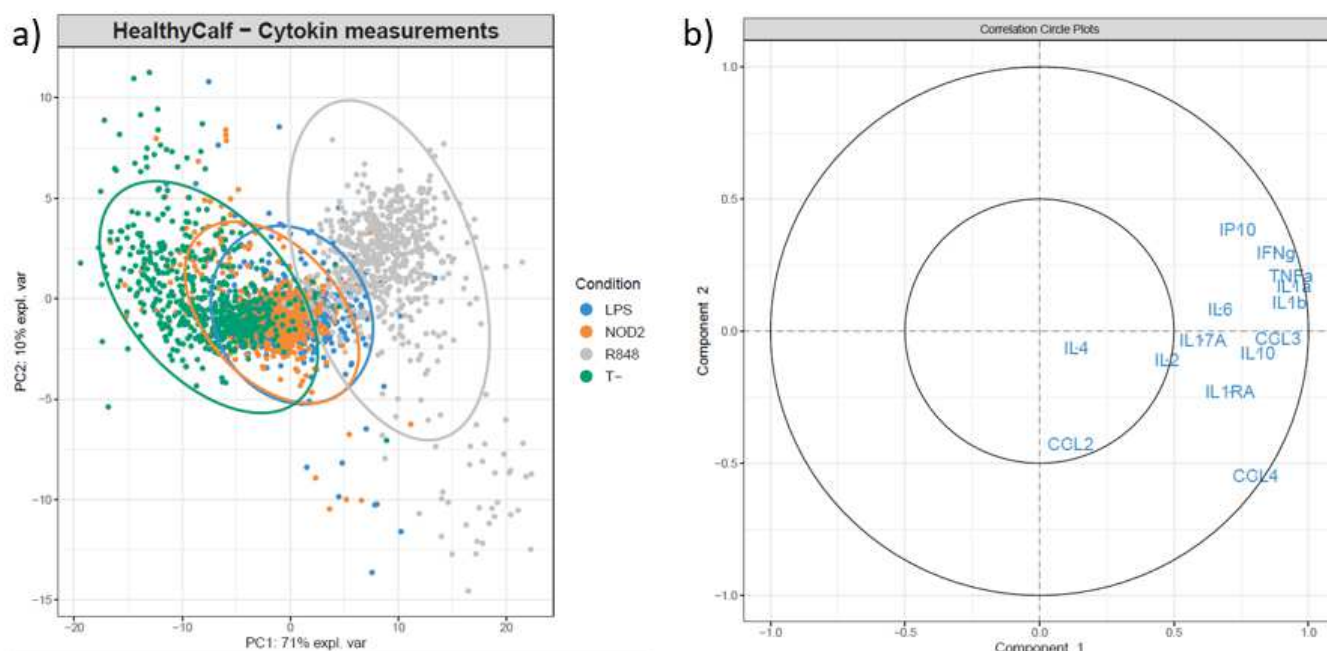


Figure 1 Résultats de l'analyse en composantes principales sur les deux premiers axes avec a) les projections de l'ensemble des échantillons colorés selon la condition de stimulation et b) le cercle des corrélations des 14 cytokines

Chromosome	Position SNPmax (mb)	du	Fréquence de l'allèle mineur	Cytokines associées (nombre de conditions associées)
2	36,0		0,13	IL1RA (4), IL6 (2)
2	72,7		0,12	IFN γ (1), IL1 α (1), IL1RA (3), IL6 (3), TNF α (1)
3	70,4		0,09	IL1RA (4), IL6 (3), TNF α (1)
7	85,4		0,16	IL1 α (1), IL1RA (4), IL6 (2), TNF α (1)
8	82,2		0,11	IL1RA (4), IL6 (2)
12	51,9		0,14	IL1RA (3), IL6 (3)
17	66,1		0,08	IFN γ (1), IL10 (1), IL1RA (4), IL6 (3), TNF α (1)
19	31,8		0,03	IL1RA (2), IL2 (2), IL6 (2), TNF α (1)
19	54,5		0,32	CCL4 (2), IFN γ (2), IL10 (2), IL1 α (3), IL1 β (3), IL1RA (2), IL2 (1), IL4 (4), PC1_LPS, TNF α (3)
24	12,5		0,24	IL17A (1), IL1 α (1), IL1 β (2), IL4 (1), PC1_LPS, TNF α (1)

Tableau 2 Détail des 10 régions identifiées par l'analyse GWAS comme associées avec un minimum de 6 caractères différents

2.2. RELATIONS ENTRE LES DIFFERENTES VARIABLES

Les résultats de l'analyse en composantes principales sont présentés Figure 1. La Figure 1a), qui montre les projections des différents individus dans chacune des 4 conditions, laisse apparaître clairement que la condition de stimulation est discriminée par le premier axe de l'ACP. Ce premier axe explique à lui seul 71% de la variance. La Figure 1b), qui représente le cercle des corrélations entre les différentes cytokines sur les deux premiers axes de l'ACP, montre que la plupart des cytokines sont corrélées entre elles suivant ce même axe 1, de sorte que cet axe 1 traduit un effet taille : les valeurs s'accroissent de gauche à droite. Deux cytokines, IL4 et CCL2, semblent toutefois plus indépendantes des autres au regard de ce premier axe. Le deuxième axe, dont l'influence est plus limitée puisqu'il n'explique que 10% de la variance, discrimine partiellement les concentrations de certaines cytokines particulières (CCL2 et CCL4 versus IP10 et IFN γ) et semble être relativement peu lié aux concentrations des autres cytokines. Il peut être noté que la proximité entre IP10 et IFN γ sur la figure reflète une proximité biologique, la sécrétion d'IP10 étant induite par l'IFN γ . Aucune structure n'a pu être observée concernant les variables environnementales tiers (ferme d'origine, année de naissance ou sexe du veau).

2.3. IDENTIFICATION DE REGIONS DU GENOME ASSOCIEES AUX CONCENTRATIONS CYTOKINIQUES

Pour l'ensemble des 64 caractères sur lesquels une analyse d'association tout génome a été réalisée, un total de 145 SNP, répartis sur l'ensemble des chromosomes, ont dépassé le seuil de significativité. D'une manière générale, les effets associés à ces SNP sont faibles, excluant la présence d'un gène majeur et orientant plutôt vers un déterminisme polygénique. Les SNP sont situés dans 40 régions différentes. Si 18 de ces régions n'ont été détectées que pour un seul caractère, les autres sont partagées entre plusieurs caractères dont 10 régions, présentées dans le tableau 2, le sont pour au moins 6 caractères différents. Parmi les régions partagées, on retrouve fréquemment la même cytokine dans plusieurs conditions de stimulation mais certaines régions sont également partagées entre différentes cytokines. Les 8 caractères issus des ACP sont associés à peu de régions, mais on peut retrouver la projection du premier axe pour le LPS associée aux deux grandes régions partagées des chromosomes 19 et 24 (tableau 2).

3. DISCUSSION

L'ensemble des résultats a permis de montrer que les mécanismes de la réponse immune innée étaient complexes mais qu'il semblait exister une part de déterminisme commun entre certaines cytokines, cela apparaissant aussi bien au travers du cercle des corrélations de l'ACP que dans l'existence de régions génomiques communes. D'autres régions seraient en revanche spécifiques de certaines cytokines et des variations pourraient parfois exister selon l'agoniste rencontré. Il faut ajouter à cela le fait que certaines des cytokines étudiées semblent assez peu sensibles aux agonistes (IL4) ou correspondaient mal aux gammes de détermination de la concentration proposées par le dispositif expérimental, ce qui a pu limiter les résultats obtenus. Il apparaît ainsi que les 14 cytokines n'ont pas toutes la même pertinence pour s'intéresser à la réponse immune innée dans les conditions expérimentales testées ici. Par exemple l'IL-4 qui est plutôt associée à la réponse adaptative est peu produite en réponse aux agonistes. Par contre généralement produites par la réponse inflammatoire répondent bien aux agonistes choisis et sont bien associées sur le cercle des corrélations (IFN- γ , IL-1 α et IL-1 β , TNF α).

Parmi l'ensemble des régions détectées comme associées à au moins un des caractères, un certain nombre d'entre elles contiennent des gènes déjà connus pour avoir un lien avec l'immunité tels que les gènes LYAR (Yang et al., 2019) et OTOP1 (Wang et al., 2014), tous deux situés dans une région du chromosome 6 associée avec CCL4 ; le gène SLC46A2 (Paik et al., 2017) localisé sur le chromosome 8 et en association avec IL6 ; le gène CXCL17 (Lee et al., 2013) situé sur le chromosome 18 et également en association avec IL6 ; le gène SEC14L (Li et al., 2013) présent dans la région fortement partagée du chromosome 19 ; le gène OTULIN (Fiil et al., 2013) situé sur le chromosome 20 et associé avec IL4 ; ou encore le gène TREX1 (Yan et al., 2010) localisé dans une région du chromosome 22 associée à IL1 β . Tous ces gènes candidats ainsi que l'ensemble des régions détectées devront faire l'objet d'une étude complémentaire approfondie, le pouvoir de détection de ce premier travail de recherche en bovin demeurant malgré tout limité par le nombre d'animaux.

CONCLUSION

Ce travail de collecte d'un grand nombre d'observations sur la réponse immune innée des veaux de race Holstein grâce à un phénotypage innovant a permis de dégager des grands principes quant à la variabilité du phénotype entre individus, aux relations existantes entre cytokines et face à différents agonistes. Un grand nombre de régions du génome influençant les caractères ont pu être déterminées, dont certains présentant des gènes candidats intéressants. Cette étude devra être poursuivie d'analyses complémentaires telles que la confrontation des profils cytokiniques avec les statuts cliniques des animaux afin de déterminer si certains éléments du profil cytokinique pourraient servir de prédicteurs de la résistance ou sensibilité aux maladies chez le jeune veau.

Les auteurs tiennent particulièrement à remercier H. Chapuy, C. Cazals, K. Toukmidine et C. Mechin, ainsi que le personnel de la ferme expérimentale INRAE du Pin-au-haras (<https://doi.org/10.15454/1.5483257052131956E12>) pour leur grande implication dans ce travail de prélèvements, et Gilles Foucras pour son travail fondamental sur la méthode de phénotypage. Cette étude fait partie du projet HealthyCalf financé par Apis-Gene.

- Fiil, B.K., Damgaard R.B., Wagner S.A., Keusekotten K., Fritsch M., Bekker-Jensen S., Mailand N., Choudhary C., Komander D., Gyrd-Hansen M. 2013. Mol Cell 50:818–830. doi:10.1016/j.molcel.2013.06.004.
- Jegou, V., Porhiel J.Y., Brunschwig P., Jouanne D. 2006. 13ème Renc. Rech. Ruminants, Paris, France. 423–426.
- Leclerc, H., Lefebvre R., Douguet M., Phocas F., Mattalia S. 2016. 23ème Renc. Rech. Ruminants, Paris, France. 149–152.
- Lee, W.-Y., Wang C.-J., Lin T.-Y., Hsiao C.-L., Luo C.-W. 2013. Am J Physiol Endocrinol Metab 304:E32–40. doi:10.1152/ajpendo.00083.2012.
- Lesueur J., Walachowski S., Barbey S., Cebon N., Lefebvre R., Launay F., Boichard D., Germon P., Corbiere F., Foucras G. 2022. Front. Immunol. 13:871780.
- Li, M.-T., Di W., Xu H., Yang Y.-K., Chen H.-W., Zhang F.-X., Zhai Z.-H., Chen D.-Y. 2013. J Virol 87:10037–10046. doi:10.1128/JVI.01073-13.
- Miglior, F., Fleming A., Malchiodi F., Brito L.F., Martin P., Baes C.F. 2017. Journal of Dairy Science 100:10251–10271. doi:10.3168/jds.2017-12968.
- Paik, D., Monahan A., Caffrey D.R., Elling R., Goldman W.E., Silverman N. 2017. J Immunol 199:263–270. doi:10.4049/jimmunol.1600409.
- Rohart, F., Gautier B., Singh A., Cao K.-A.L. 2017. PLOS Computational Biology 13:e1005752. doi:10.1371/journal.pcbi.1005752.
- Wang, G.-X., Cho K.W., Uhm M., Hu C.-R., Li S., Cozacov Z., Xu A.E., Cheng J.-X., Saltiel A.R., Lumeng C.N., Lin J.D. 2014. Diabetes 63:1340–1352. doi:10.2337/db13-1139.
- Yan, N., Regalado-Magdos A.D., Stiggelbout B., Lee-Kirsch M.A., Lieberman J. 2010. Nat Immunol 11:1005–1013. doi:10.1038/ni.1941.
- Yang, C., Liu X., Cheng T., Xiao R., Gao Q., Ming F., Jin M., Chen H., Zhou H. 2019. J Virol 93:e00769-19. doi:10.1128/JVI.00769-19.